

テロメア近傍におけるヘテロクロマチン制御機構の
解明

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2024-04-01 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 綾野, 貴仁 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10098/0002000165

福井大学審査
学位論文 [博士 (工学)]

テロメア近傍における
ヘテロクロマチン制御機構の解明

2024年3月
綾野 貴仁

目次

1 緒言	1
2 試薬と機器	5
3 実験方法	9
3.1 滅菌操作	
3.1.1 オートクレーブ処理	
3.1.2 DNase free、RNase free 滅菌	
3.1.3 フィルター滅菌	
3.2 培地組成	10
3.2.1 出芽酵母 <i>Saccharomyces Serevisiae</i> 用培地	
3.2.2 大腸菌 (<i>E.coli</i>) 用培地	
3.3 菌株の保存	11
3.3.1 出芽酵母の保存	
3.3.2 大腸菌 (<i>E.coli</i>) の保存	
3.4 DNA マーカー	
3.5 酵母・プライマーリスト	12
3.5.1 酵母株リスト	
3.5.2 プライマーリスト	15
3.6 遺伝子操作	16
3.6.1 <i>E.coli</i> の形質転換	
3.6.2 PCR 法	
3.6.2.1 TaKaRa Tks Gflex DNA Polymerase	
3.6.2.2 EmeraldAmp Max PCR Master Mix	
3.6.3 PCR 産物精製	
3.6.4 制限処理法	17
3.6.5 ゲル切り出し精製	
3.6.6 ライゲーション	
3.6.7 プラスミド抽出法 (アルカリ法)	18
3.6.8 DNA 配列解析	
3.6.9 出芽酵母の形質転換法	19
3.7 RNA 実験	
3.7.1 <i>S.cerevisiae</i> からの RNA 抽出	

3.7.2 RNA 中による DNA の分解 (DNase 処理)	20
3.7.3 逆転写	
3.7.4 rPCR による転写量解析	
3.7.5 DNA マイクロアレイ	21
3.8 タンパク質実験	23
3.8.1 WESTERN BLOTTING の sample 調製	
3.8.2 SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE)	
3.8.3 ウェスタンブロッティング	24
3.8.4 FLAG Purification	25
3.9 クロマチン免疫沈降法 (Chromatin Immunoprecipitation)	27
3.10 顕微鏡観察	30
3.11 一細胞追跡実験	31
4 実験結果・考察	32
4.1 第 1 章 III 番染色体右腕における SAGA-TBP の境界制御機構の解析	
4.1.1 Spt3 及び、Spt8 はサブテロメア領域内の遺伝子発現を制御している	
4.1.2 Spt3 及び Spt8 はサブテロメア領域の境界制御に関わる	33
4.1.3 Spt3 と TBP の相互作用は境界形成に重要である	34
4.1.4 SAGA 複合体は境界形成に必要である	37
4.1.5 Spt3 と TBP の変異はサイレンシング領域の慎重を引き起こす	38
4.1.6 考察	39
4.2 第 2 章 IMD2 領域におけるヒストン修飾因子の機能解析	41
4.2.1 8 番染色体右腕においては Spt8 が境界制御に寄与する	
4.2.2 境界制御において SAGA の安定化には Spt8 が必要である	42
4.2.3 8 番染色体右腕の境界制御には複数の HAT 関連因子が複合的に機能する	44
4.2.4 8 番染色体右腕では HAT 関連因子の使い分けで発現状態が制御される	46
4.2.5 考察	48
4.3 第 3 章 GTP 依存的なヘテロクロマチン領域制御の 1 細胞解析	52
4.3.1 IMD2 のサイレンシングは GTP 依存的に解除される	
4.3.2 ヘテロクロマチンの安定性は細胞ごとに異なる	53
4.3.3 IMD2 は細胞集団で不均一に発現している	56
4.3.4 IMD2 の不均一性はヒストン脱アセチル化酵素と GTP により制御される	60
4.3.5 考察	62

5 結言	64
6 参考文献	65
7 謝辞	73

1 緒言

出芽酵母におけるヘテロクロマチン（サイレンシング）領域制御

遺伝子発現はクロマチン構造によって制御されている。活性化された遺伝子領域では、ヌクレオソームは互いに離れており、ユークロマチンと呼ばれる緩やかなクロマチン構造を形成している。対照的に、サイレンシングされた遺伝子の領域では、個々のヌクレオソームは収束し、凝縮したクロマチンのヘテロクロマチン構造を形成する。これらの特徴的なクロマチン構造は、細胞分裂を経ても安定して維持され、伝達される。しかし、すべてのクロマチン状態が生涯を通じて維持されるわけではない。クロマチン構造は、遺伝子発現パターンの変化により、発生や分化の過程で変化することがある。

出芽酵母では、HM、rDNA、テロメア領域が転写的にサイレンシングされていることが知られている[1-5]。rDNA 領域は Sir2 を含む RENT 複合体によってサイレンシングされ[6-10]、一方、HM 領域とテロメア領域では、Sir2/3/4 複合体が Sir2 を介した H4K16 の脱アセチル化によって低アセチル化ヘテロクロマチンを形成し、維持している。また最近、HM 領域での安定したサイレンシング状態の維持は、Sir4 の量に依存していることが報告された[11]。しかし、ヘテロクロマチン領域が拡大し続けると、必須遺伝子も抑制されてしまうため、Sir 複合体を介した拡大を抑制するために染色体に境界が形成される[12, 13]。報告されている境界形成機構には、HML 下流の CHAI 遺伝子プロモーターや HMR 近傍のスレオニン転移 RNA (tRNA) 遺伝子など、DNA 配列依存的な境界があり、これらの特徴的な配列では、ヌクレオソームを含まない領域が形成され、境界として機能している[14-16]。また、ヒストン修飾が境界として働くことも報告されており、サブテロメア領域において H4K16 のヒストンアセチル化 (HAT) 活性を持つ Sas2 が Sir2 と競合することにより、DNA 配列非依存的な境界を形成することが報告されている[17-19]。しかし、Sas2 以外のヒストンアセチル化に関する因子には、HAT 活性を持つ Gcn5 が含まれる SAGA、Sas3 を持つヒストン H3 アセチル化酵素複合体 NuA3[20]、必須遺伝子 Esa1 を含むヒストン H4 アセチル化酵素複合体 NuA4[21-24]、H3K56 のアセチル化活性を持つ Rtt109[25]等、複数種類が存在するが、それぞれが境界制御にどのような役割を担っているかは明らかになっていない。また、境界制御では Sir 複合体によるヒストン脱アセチル化が必要であるが、その他の HDAC 活性を持つ HAD family の一つ hda1 や[26, 27]、Rpd3 複合体において HDAC 活性を持つ Rpd3[28]が境界制御に関わるのかは明らかになっていない。そのため、境界として機能するヒストン修飾因子の種類や、ヒストン修飾因子間の関係、機能する染色体領域の特異性等、境界制御におけるヒストン修飾因子の関与は未だに不明瞭である。

境界形成に機能する SAGA 複合体

これまでに出芽酵母における境界形成因子は、HMR 領域を用いたスクリーニングに

より同定されている[13, 29, 30]。その中には Sas2 以外のヒストン修飾因子として、ヒストン H4 アセチル化複合体である NuA4 の構成因子やヒストンメチル化に関わる Dot1 も含まれていた[31-33]。特に同定された遺伝子の中にはヒストンアセチル化と、ヒストン H2B の脱ユビキチン化を介して転写を活性化する SAGA 複合体の構成因子が多く含まれていた。SAGA 複合体は 19 種のタンパク質から構成され、HAT 活性を持つ Gcn5 や、ヒストン H2B の脱ユビキチン化活性を持つ Ubp8 がヒストンの修飾状態を制御するだけでなく、転写を開始する TBP (TATA-binding protein) と相互作用し転写の活性化に機能することが報告されている[34-42]。我々はこれまでに、境界形成における SAGA 複合体の影響を解析し、境界形成への影響を報告してきた。我々の研究グループはこれまでに SAGA 複合体の構成因子に注目し、脱ユビキチン化活性を持つ Sgf73 や、ヒストン H3 の 9 番リジン残基のジメチル化及び、トリメチル化の認識に関わる Sgf29、コア構成因子である Adal が境界形成に重要であることを報告している[43-45]。このように SAGA 複合体がヒストン修飾を制御し、境界を制御することを明らかにしてきたが、SAGA の重要な機能である TBP との相互作用が境界形成に及ぼす影響はわかっていない。実際、境界形成因子のスクリーニングの結果には、TBP (Spt15) も含まれていたため、SAGA 複合体において、TBP と相互作用する Spt3 及び Spt8 が境界形成に機能することが予想される。

TBP 相互作用タンパク質 Spt3 及び Spt8 の機能

Spt3 及び Spt8 は SAGA 複合体の構成因子であり、共に TBP と相互作用することで遺伝子の発現を活性化または抑制する[34, 46-52]。遺伝子発現抑制の例として、Spt3 と Spt8 が TBP と結合することで TBP の TATA 配列への誘導が低下し、*HIS3* 遺伝子や *TRP3* 遺伝子の発現が抑制される[53, 54]。しかし、Spt3/Spt8 の TBP との相互作用が低下することで、TATA 配列へ TBP が運ばれ、転写が活性化する[49]。その他にも、HAT 活性を持つ Gcn5 は Snf1 によるリン酸化によって活性化するが、Spt3 が Snf1 との相互作用部位と同じ部位で Gcn5 と相互作用で、Gcn5 のリン酸化を阻害することで、抑制に働くことも報告されている[52]。また、*SPT3* 遺伝子の欠損は、出芽酵母の交配に関わる a/α 因子をコードする遺伝子の転写を低下させることで、交配に異常を生じさせることが報告されている[55]。一方、Spt8 は TBP だけでなく転写伸長因子 S-II (TFIIS/Dst1) と相互作用によっても転写を活性化する[34]。さらに SAGA 複合体とほぼ同様の機能と構造を持つ SAGA-Like (SLIK) 複合体では Spt8 と結合する Spt7 の C 末端が切断されることで、TBP との相互作用には Spt3 のみが機能する[55-59]。このように Spt3 と Spt8 は似た機能を有しているが、境界形成における Spt3 と Spt8 の使い分けや、染色体特異性のメカニズムは依然として不明瞭なままである。

IMD2の制御機構

8番染色体右腕のサブテロメア領域に位置する遺伝子 *IMD2* はイノシン酸デヒドロゲナーゼ (IMPDH) をコードしており、この酵素は *de novo* 経路の GTP 生合成においてイノシン酸 (IMP) からキサントシン酸 (XMP) への合成を触媒し、生体内の GTP 量の調節に関わっている[60, 61]。出芽酵母において、IMPDH をコードする遺伝子は4つ存在する (*IMD1/2/3/4*) が[62]、なかでも *IMD2* 由来の IMPDH は IMPDH の阻害剤であるマイコフェノール酸 (MPA) に対する耐性を持っており[63-65]、高濃度の MPA 添加による GTP 枯渇時には必須の遺伝子である。通常、*IMD2* は DNA 配列依存的に抑制されており、生体内の GTP が豊富な時は転写が抑制エレメント (RE) 領域で止められるが[66-68]、MPA などにより GTP が枯渇した時には転写開始点を RE の上流から下流に切り替えることで、転写抑制を受けることなく ORF 領域が転写されることが報告されている[69-74]。この転写抑制には、転写活性化因子として知られる Sub1 が機能し[75, 76]、Sub1 の欠損により GTP 濃度に関わらず、*IMD2* が誘導されることも報告されている[77, 78]。また、*IMD2* の MPA に対する感受性スクリーニングでは、SAGA 複合体のコア構成因子である Spt7、Spt20 及び、TBP と相互作用する Spt3、Spt8 の欠損時には感受性が増加し[79]、特に Spt8 に関しては Dst1 (TFIIS) との二重欠損が更なる MPA 感受性の増加を引き起こすことが報告されている[79, 80]。また、*IMD2* は Sir 複合体によるサイレンシングの影響下に在ることも報告されており[5, 8]、DNA 配列非依存的なサイレンシングと DNA 配列依存的な転写抑制により、通常発現が強く抑えられている。しかし、*IMD2* 領域における SAGA の機能や、境界形成因子、GTP 濃度の変化とサイレンシング解除の関係は明らかになっていない。

細胞集団におけるエピミュータントの制御機構

出芽酵母とは異なり、分裂酵母のヘテロクロマチンは H3K9me 依存的に形成されるが、染色体における異所性ヘテロクロマチン形成を抑制するために抗サイレンシング因子が機能している。しかし、近年カフェインに応答して、クロマチン構造を変化させ、新規ヘテロクロマチン領域を形成することにより、薬剤耐性を獲得したエピミュータントが細胞集団中から生じることが報告されている[81, 82]。また、線虫において低分子 RNA エピミュータントが何世代にもわたって自然発生することも報告されている[83, 84]。このように、エピミュータントは環境変化に強く、ホメオスタシスに必要なが、エピミュータントが生じる詳細なメカニズムは解明されていない。

我々はこれまでに、出芽酵母を用いて、単一細胞の遺伝子発現状態を追跡するシステムを開発し、ヘテロクロマチン領域の変動が境界によって制御されていることを示した[85]。その中で、細胞集団において一部の細胞ではテロメア近傍のヘテロクロマチンの影響が異なることを明らかにしてきた。しかし、ヘテロクロマチン領域が変動する詳細な条件、つまり変動の切っ掛けや、変動する領域、変動による制御の生物学的な意義等

は明らかになっていない。

本学位論文において、初めに境界形成における SAGA-TBP の影響を確認するため、III 番染色体右腕サブテロメア領域に注目し、この領域の境界形成能は Spt3 および Spt8 が TBP と相互作用する機能に依存していることを明らかにした。次に、Spt3 及び Spt8 の境界制御の染色体特異性を明らかにするため、8 番染色体右腕の *IMD2* 遺伝子に注目し、SAGA 複合体の境界形成能、また SAGA 複合体以外のヒストン修飾関連因子の影響を解析した。最後に、*IMD2* 領域のヘテロクロマチン制御に着目し、蛍光タンパク質をレポーターとした一細胞追跡法により、サブテロメア領域におけるヘテロクロマチンの変動を解析し、GTP レベルに応答する新規ヘテロクロマチン制御機構を同定した。

2 試薬と機器

本研究に用いた試薬と機器を以下に示す。試薬に関してはここに示した以外のものはナカライテスク株式会社あるいは富士フィルム和光純薬株式会社の試薬を用いた。

Table1 試薬と器具

Bacto™ Yeast Extract (No.212750)	BD
Bacto™ Peptone (No.211677)	BD
Bacto™ Tryptone (No.211705)	BD
Difco™ Yeast Nitrogen Base w/o Amino Acids (No.291940)	BD
Hi-Di™ Formamide (No.75-12-7)	Applied Biosystem
分光光度計 (V-630BIO)	日本分光
Agarose S (No.312-01193)	和光純薬株式会社
制限酵素	タカラバイオ株式会社
Primer	ユーロフィン
EmeraldAmp MAX PCR Master Mix (No.RR320A)	タカラバイオ株式会社
Tks Gflex DNA polymerase (No.R060A)	タカラバイオ株式会社
Deoxyribonucleic acid sodium salt, From Slmon Testes (No.9007-49-2)	SIGMA-ALDRICH
illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band purification Kit (No.28-9034-71)	GE Healthcare
GenElute™ plasmid Miniprap Kit (No.PLN350-1KT)	SIGMA-ALDRICH
滅菌フィルター (MILLEX-GS) (No.SS-05SZ)	ADVANTEC
シリンジ	テルモ株式会社
キュベット	Bio-Rad
遠心分離機 (FB-4000)	KURABO
冷却遠心分離機 (centrifuge 5417R)	eppendorf
遠心分離機 (centrifuge 5418)	eppendorf
高速冷却遠心機 (6200)	KUBOTA
クリーンベンチ (MCV-710ATS)	三洋電機株式会社
クリーンベンチ (MCV-B161S)	三洋電機株式会社
高圧蒸気滅菌器 (MLS-3020)	三洋電機株式会社
高圧蒸気滅菌器 (MLS-2420)	三洋電機株式会社
乾燥機 (MOV-212(U))	三洋電機株式会社
分光光度計 (UV-1200)	島津製作所
振とう培養器 (TB-C-50R)	高崎科学機械株式会社

振とう培養器 (TC-C-200R)	高崎科学機械株式会社
インキュベーター (CI-310)	ADVANTEC
インキュベーター (MIR-553)	三洋電機株式会社
インキュベーター (CI-450SM)	Iuchi
ドライバスインキュベーター (FG-01N)	FastGene
ドライバスインキュベーター (MD-02N110)	Major science
ブロックインキュベーター (BI-516)	ASTECC
シェーカー (EYELA)	東京理科機械株式会社
シェーカー (DOUBLE SHAKER NR-3)	TAITEC
マイクロチューブローテーター (MTR-103)	Iuchi
サーマルサイクラー (PC320)	ASTECC
ハンディー UV ランプ	フナコシ
UV トランスイルミネーター (UVT-2126)	ASTECC
アガロースゲル電気泳動装置	ADVANCE
ゲル撮影装置	ASTECC
pH メーター	東亜 DKK 株式会社
蒸留水製造装置 (RFD210TA)	ADVANTEC
超純水製造装置	日本ミリポア株式会社
ボルテックスミキサー	M&S 機械株式会社
上皿天秤 (AV2102C)	Ohaus
微量天秤 (R1800)	カールツァイス株式会社
ハイエンド電動倒立顕微鏡 Axio Observer.Z1	カールツァイス株式会社
LED 光源 Colibri	カールツァイス株式会社
AxioCam MRm	カールツァイス株式会社
メタルハライドランプ HXP	OSRAM
Cell Asic ONIX 2	ONIX
Y04C Microfluidic Plate	ONIX
Micro Slide Glass (白緑磨 No.2) (No.S1112)	MATSUNAMI
Micro Cover Glass (18×18 mm) (No.C218181)	MATSUNAMI
-80°Cstock チューブ 1.2ml (No.430487)	CORNING
Realtime PCR (StepOne Real time PCR System)	Applied Biosystem
Power SYBR Green Master Mix	Applied Biosystem
Ampicillin Sodium (No.018-10372)	和光純薬株式会社
G418 (No.078-04501)	和光純薬株式会社
D (+)-Glucose (No.041-00595)	和光純薬株式会社

Agar (No.010-15815)	和光純薬株式会社
塩化ナトリウム (No.191-01665)	和光純薬株式会社
塩化カリウム (No.163-03545)	和光純薬株式会社
塩化マグネシウム (No.135-00165)	和光純薬株式会社
グリセリン (No.075-00616)	和光純薬株式会社
λ-DNA (No.318-05291)	NIPPON GENE
One STEP Ladder 100 (0.1~2kbp) (No.313-05241)	NIPPON GENE
塩化カルシウム (No.031-00435)	和光純薬株式会社
EDTA (No.15111-45)	ナカライテスク株式会社
水酸化ナトリウム (No.198-13765)	和光純薬株式会社
酢酸ナトリウム (No.31137-25)	ナカライテスク株式会社
酢酸 (No.017-00251)	和光純薬株式会社
BigDye terminator v3.1 Cycle sequencing Kit (No.4336917)	Applied Biosystem
エタノール (No.057-00456)	和光純薬株式会社
塩酸(No.080-01066)	SIGMA-ALDRICH
Tris (No.204-07885)	和光純薬株式会社
リン酸水素二ナトリウム (No.31726-05)	ナカライテスク株式会社
リン酸二水素カリウム (No.164-04315)	和光純薬株式会社
ソルビトール (No.198-03755)	和光純薬株式会社
L-ヒスチジン塩酸塩-水和物 (No.084-00702)	和光純薬株式会社
L-ロイシン (No.124-00852)	和光純薬株式会社
L-リジン-塩酸塩 (No.121-01462)	和光純薬株式会社
L-トリプトファン (No.204-03382)	和光純薬株式会社
L-メチオニン (No.21719-02)	ナカライテスク株式会社
アデニン硫酸塩・二水和物 (No.100195)	和光純薬株式会社
ウラシル (No.212-00062)	和光純薬株式会社
Ethidium Bromide (No.315-90051)	和光純薬株式会社
Ligation-Convenience Kit (No.319-05961)	タカラバイオ株式会社
ONPG (No.142-04691)	和光純薬株式会社
Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O (No.196-02835)	和光純薬株式会社
Hi-Di formamide (No.4311320)	Applied Biosystems
KOH (No.163-03545)	和光純薬株式会社
DMSO (No.043-07216)	和光純薬株式会社
PEG4000 (No.162-09115)	和光純薬株式会社

SDS (No.196-08675)

酢酸リチウムニ水和物(No.126-01532)

和光純薬株式会社

和光純薬株式会社

3 実験方法

3.1 滅菌操作

3.1.1 オートクレーブ処理

作成した培地、培養に用いた試験管、三角フラスコ、バツフルフラスコ、シリコン栓はオートクレーブ処理したものを使用した。

オートクレーブ処理は 121°C、20 分行った。

3.1.2 DNase free、RNase free 滅菌

本研究で DNA や RNA 操作に用いたピペットチップ、サンプルチューブ、爪楊枝はオートクレーブ処理したものを使用した。

オートクレーブ処理は 121°C、20 分行き、乾燥機内で完全に水蒸気を取り除いたものを使用した。

3.1.3 フィルター滅菌

本研究で用いたアンピシリン、SDS 等のオートクレーブ処理できない試薬類はフィルターを用い滅菌処理した。

3.2 培地組成

本研究で用いた培地の組成を以下に示す。

3.2.1 出芽酵母 *Saccharomyces Serevisiae* 用培地

YMD 培地

0.67 % Yeast Nitrogen Base (without amino acids)、2% Bacto-Agar (プレート作製時) を蒸留水で混合し、121°C 20 分でオートクレーブ後、20% グルコースを 2% になるように加えた。

Casamido acid 培地

0.67 % Yeast Nitrogen Base (without amino acids)、2% casamido acid、2% Bacto-Agar (プレート作製時) を蒸留水で混合し、121°C 20 分でオートクレーブ後、20% グルコースを 2% になるように加えた。

YPD 培地

1% Yeast Extract、2% Peptone、2% Bacto-Agar (プレート作製時) を蒸留水で混合し、121°C 20 分でオートクレーブ後、20% グルコースを 2% になるように加えた。

YPD 培地 + G418

YPD 培地に最終濃度 0.2 mg/ml となるように G418 を加えた。

Amino Acid Mixes (100×)

以下の組成で蒸留水に溶かした後フィルター滅菌した。0.3% Adenine、0.2% Histidine、0.4% Leucine、0.4% Lysine、0.3% Tryptophan、0.2% Uracil。

YMD 培地 + Amino Acid Mixes

YMD 培地に最終濃度 (1×) になるように Amino Acid Mixes (100×) の溶液を加えた。

3.2.2 大腸菌 (*E.coli*) 用培地

LB 培地

以下の組成で蒸留水に溶かした後、フィルター滅菌した。0.5% Yeast Extract、1% Bacto Triptone、0.5% NaCl、1.5% Agar (プレート作製時)。

LB+Amp 培地

LB 培地をオートクレーブ後、60°C程度まで冷ましてからアンピシリンを最終濃度 100 mg/ml となるように加えた。

3.3 菌株の保存

3.3.1 出芽酵母の保存

短期保存 (プレート保存)

本研究で用いた酵母の短期保存はプレートを用いて行った。滅菌爪楊枝を用いてプレートに植菌し、37°Cで2日培養したプレートを低温(4°C)で保管した。酵母がプラスミドを持つ場合、YMD培地に酵母に対応するアミノ酸を塗り培養した。

長期保存 (グリセロールストック法)

本研究で用いた酵母の長期保存はグリセロールストック法を用いて行った。酵母をYPD培地プレート上で培養し、60%グリセロール250 μ lとYPD培地750 μ lが入ったスクリーキャップ付きチューブにプレート上の酵母を懸濁し、-80°Cで保存した。

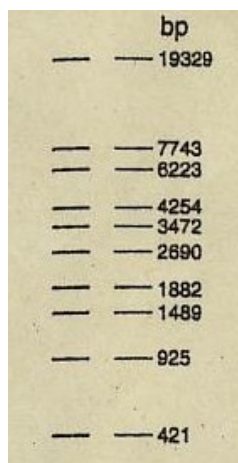
3.3.2 大腸菌 (*E.coli*) の保存

短期保存 (プレート保存)

本研究で用いた大腸菌の短期保存はプレートを用いて行った。滅菌爪楊枝を用いてプレートに植菌し、37°Cで1日培養したプレートを低温(4°C)で保管した。大腸菌体内にAmp^r(Ampicillin耐性遺伝子)を持つプラスミドを保有している場合にはLB+Ampプレートを、保有していない場合にはLBプレートを、用いた。

3.4 DNA マーカー

本研究では λ -DNAをEcoT14 I処理したものをアガロース電気泳動のサイズマーカーとして使用した。このサイズマーカーの泳動パターンを以下に示す。



3.5 酵母・プライマーリスト

本研究に用いた酵母株及びプライマーのリストとして以下に示す。

3.5.1 酵母株リスト

Table 2 酵母株リスト

Strain No.	Genotype
FUY 737	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 sir4Δ::KanMX</i>
FUY 739	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 sas2Δ::KanMX</i>
FUY 742	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 sas3Δ::KanMX</i>
FUY 745	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 sir3Δ::KanMX</i>
FUY 746	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 eaf3Δ::KanMX</i>
FUY 748	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 sir2Δ::kanMX</i>
FUY 750	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 dot1Δ::KanMX</i>
FUY 752	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 gcn5Δ::KanMX</i>
FUY 753	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 spt20Δ::KanMX</i>
FUY 837	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i>
FUY 838	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0</i>
FUY 915	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 gcn5Δ::KanMX sir3Δ::hphMX</i>
FUY 1473	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 spt3Δ::KanMX</i>
FUY 1511	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 spt3Δ::KanMX sir3Δ::hphMX</i>
FUY 1546	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 spt8Δ::KanMX sir3Δ::hphMX</i>
FUY 1548	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 spt8Δ::KanMX</i>
FUY 1559	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 spt7Δ::KanMX</i>
FUY 1584	<i>MATα leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 his3Δ::HTB1-2xmCherry-HIS3</i>
FUY 1624	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 sir3Δ::HphMX</i>
FUY 1657	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 spt3Δ::KanMX sir3Δ::HphMX</i>

FUY 1658	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 spt8Δ::KanMX sir3Δ::HphMX</i>
FUY 1662	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 SPT3::3xFlag-SPT3</i>
FUY 1663	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 SPT7::3xFlag-SPT7</i>
FUY 1664	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 SPT8::3xFlag-SPT8</i>
FUY 1665	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 TBP(SPT15)::3xFlag-TBP(SPT15)</i>
FUY 1732	<i>MATα leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 his3Δ::HTB1-2xmCherry-HIS3 imd2Δ::IMD2-URA3-HTB1-EYFP</i>
FUY 1735	<i>MATα leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 his3Δ::HTB1-2xmCherry-HIS3 imd2Δ::HTB1-EYFP</i>
FUY 1757	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 spt3Δ::Flag-spt3(Y193C)</i>
FUY 1758	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 spt3Δ::Flag-spt3(E240K)</i>
FUY 1759	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 spt15Δ::Flag-spt15(T153I)</i>
FUY 1760	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 spt15Δ::Flag-spt15(R171E)</i>
FUY 1761	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 spt15Δ::Flag-spt15(G174E)</i>
FUY 1762	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 spt3Δ::Flag-spt3(Y193C) sir3Δ::HphMX</i>
FUY 1763	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 spt3Δ::Flag-spt3(E240K) sir3Δ::HphMX</i>
FUY 1764	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 spt15Δ::Flag-spt15(T153I) sir3Δ::HphMX</i>
FUY 1765	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 spt15Δ::Flag-spt15(R171E) sir3Δ::HphMX</i>
FUY 1766	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 spt15Δ::Flag-spt15(G174E) sir3Δ::HphMX</i>
FUY 1788	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 rpd3Δ::KanMX</i>
FUY 1807	<i>MATα leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 his3Δ::HTB1-2xmCherry-HIS3 imd2Δ::HTB1-EYFP sir3Δ::KanMX</i>
FUY 1824	<i>MATα leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 his3Δ::HTB1-2xmCherry-HIS3 imd2Δ::HTB1-EYFP spt8Δ::KanMX</i>
FUY 1840	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 spt7Δ::SPT7(1-1141)-3xFlag</i>

FUY 2072	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 spt7Δ::KanMX sir3Δ::hphMX</i>
FUY 2191	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 hda1Δ::KanMX</i>
FUY 2194	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 rtt109Δ::KanMX</i>
FUY 2212	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 spt7Δ::SPT7(1-1141)-3xFlag sir3Δ::hphMX</i>
FUY 2213	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 dst1Δ::KanMX</i>
FUY 2216	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 ubp8Δ::KanMX</i>
FUY 2220	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 sub1Δ::KanMX</i>
FUY 2222	<i>MATα leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 his3Δ::HTB1-2xmCherry-HIS3 imd2Δ::HTB1-EYFP sub1Δ::KanMX</i>
FUY 2381	<i>MATα leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 his3Δ::HTB1-2xmCherry-HIS3 imd2Δ::HTB1-EYFP eaf3Δ::KanMX</i>
FUY 2382	<i>MATα leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 his3Δ::HTB1-2xmCherry-HIS3 imd2Δ::HTB1-EYFP rtt109Δ::KanMX</i>

3.5.2 プライマーリスト

Table 3 プライマーリスト

Primer No.	Sequence
832-GIT1/YCR098C-F	CCAAAAGAGGTGGTATCCTGGTT
833-GIT1/YCR098C-Rv	TGGACCACCGAAGGCTAGTG
834-YCR099C-F	AATGCAAAAAGCCCATGGAA
835-YCR099C-Rv	CTCTCCCTCAGGATTTTTTTCACA
837-YCR100C-C	GGGCCACCCTCCATGTTAG
838-YCR101C-F	TGGGAAACGGTCAAAGAAATTG
839-YCR101C-Rv	CCATGGAAAGGATCAACAGTAAATC
842-YCR102W-A-F	GAGGAAAAGTTTGAAGAACAAAAA
843-YCR102W-A-Rv	CTCCCCGTAAAGAATGCTTGAT
852-AAD3/YCR107W-F	GCGCCTCCGAACAAACAG
853-AAD3/YCR107W-Rv	AGCAATCTTGGCCAATGCTT
854-YCR108C-F	CCATGGCCCATTCTCACTAAA
855-YCR108C-Rv	CAAGTGCCGTGCATAATGATG
1503-836-YCR100C-F	CGATCGGAAGGACCGAAAA
1707-851-RDS1/YCR106W-2Rv	GGACATAGCGGTATTGGCTTTT
1708-oki264 GIT1-F	TGGATGTGCGTACGACCAAT
1709-oki265 GIT1-Rv	ACCTGGTCCAGCATTACCTAACA
1719-847-ADH7/YCR105W-Rv	TCTCCGCTTCCATCCTTGT
2882-846-ADH7/YCR105W-F	AAACTTCCGATCAGCGAAGAAG
2883-850-RDS1/YCR106W-2F	GCCAGATGGAGGATGCAGTT
ACT1-F	TCGTTCCAATTTACGCTGGTT
ACT1-Rv	CGGCCAAATCGATTCTCAA
IMD2-F	TGTCGTTGACAAAGGATCCATTA
IMD2-Rv	GCCGATGTCTTGACAGGAATGT

3.6 遺伝子操作

3.6.1 *E.coli* の形質転換

DNA 1 μ l にコンピテントセル (40 μ l~200 μ l) を加え、氷上で 20 分静置した。静置後 42 °C で 45 秒間熱ショックを与え、氷上で 5 分間冷却した。室温で 2 分間静置し、SOC 培地を 9 倍量加え、37°C で 30 分静置した。6000 rpm で 3 分室温で遠心し、100 μ l 残して上清を除去した。残した 100 μ l で抗生物質入りの LB 培地プレートに塗布した。37°C で 12 時間から 16 時間培養した。

3.6.2 PCR 法

DNA 断片の増幅は PCR 法により行った。

3.6.2.1 TaKaRa Tks Gflex DNA Polymerase

2x Gflex PCR Buffer を 25 μ l、増幅したい領域の Primer set を最終濃度 0.4 μ M となるように加え、テンプレート DNA を 1 μ l、Tks Gflex DNA Polymerase 1 μ l を加え、蒸留水で全量 50 μ l にした。PCR は以下の方法で行った。

94°C 1min, (98°C 10sec, 60°C 15sec, 68°C 30sec/kb) x 30cycles

PCR 後に電気泳動により、増幅産物を確認した。

3.6.2.2 EmeraldAmp MAX PCR Master Mix

EmeraldAmp MAX PCR Master Mix を 25 μ l、増幅したい領域の Primer set を最終濃度 0.4 μ M となるように加え、テンプレート DNA を 1 μ l 加え、蒸留水で全量 50 μ l にした。PCR は以下の方法で行った。

(98°C 10sec, 60°C 30sec, 72°C 1min/kb) x 30cycles

PCR 後に電気泳動により、増幅産物を確認した。

3.6.3 PCR 産物精製

PCR 産物の精製には GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE health care Bioscience) を使用した。

PCR によって得られた産物の精製を以下の手順で行った。PCR 産物に滅菌水を加えて 100 μ l に調整し、Capture Buffer を 500 μ l 加えた。Collection tube に Binding Column を乗せ、Binding Column に混合液を移し、室温に 1 分間放置した。14,000 rpm、1 min で遠心後 Collection tube 内の液を除去後、Wash Solution 500 μ l を Binding Column に加える。14,000 rpm、1 min 遠心後、Collection tube 内の液を除去後、14,000 rpm、1 min 遠心後、Binding Column を新しいエッペンチューブに移した。20 μ l の溶出 Buffer を Binding Column に加え、室温に 1 分放置した。14,000 rpm、1 min 遠心後、Binding Column を取り除いた。アガロースゲル電気泳動により精製の収率を確認した。

3.6.4 制限処理法

サンプル DNA 任意の量、10x Buffer を全体量の 10 分の 1 なるように調節、制限酵素を 1 μ l、滅菌水で任意の量に調節し混合した。混合液を 37°C で 1 時間インキュベートし、電気泳動で確認した。

3.6.5 ゲル切り出し精製

DNA サンプルのゲル切り出し精製には GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE health care Bioscience) を使用した。

DNA サンプルをアガロースゲル電気泳動により分離し、エチジウムブロマイド (EtBr) により染色後、目的の DNA 断片を含むゲル断片を切り出した。新しいエッペンチューブにゲル断片を移し、ゲル断片の重量を測定し、ゲル断片 10 mg に対して 10 μ l の Capture Buffer を加え、60°C でゲル断片が完全に溶解するまで保温した。Collection tube に Binding Column を乗せ、ゲル溶解液を Binding Column に移し、室温に 1 min 静置した。14,000 rpm で 1 分遠心後 Collection tube 内の液を除去後、500 μ l の Wash Solution を Binding Column に加え、14,000 rpm で 1 min 遠心後、Collection tube 内の液を除去した。14,000 rpm で 1 min 遠心後、Binding Column を新しいエッペンチューブに移し、20 μ l の溶出 Buffer を Binding Column に加えた。室温に 1 min 放置し、14,000 rpm で 1 分遠心した。アガロースゲル電気泳動により確認した。

3.6.6 ライゲーション

Ligation-Convenience kit (code:319-05961) を用いてライゲーションを行った。ベクター DNA と インサート DNA をそれぞれの長さの比によって混合比を変えた。ベクター DNA とインサート DNA は等量程度の重量 (ng) での混合が最も効率が良くなるため、DNA 濃度によって混合比を変更した。

インサート DNA と ベクターDNA を合計 5 μ l になるように混合し、2 \times Ligation を 5 μ l 加えて混合した。16°C で 15 分静置した。混合液と 100 μ l のコンピテントセルを混ぜ、氷上で 20 分静置後、42 °C で 45 秒間熱ショックを与え、氷上で 5 分間冷却した。室温で 2 分間静置し、SOC 培地を 9 倍量加え、37°C で 30 分静置した。6000 rpm で 3 分室温で遠心し、100 μ l 残して上清を除去後、抗生物質入りの LB 培地プレートに塗布した。37°C で 12 時間から 16 時間培養した。

3.6.7 プラスミド抽出法（アルカリ法）

大腸菌を LB 培地（抗生物質入り）5 ml で 37°C 220 rpm 12 時間から 16 時間培養した。培養液をエッペンに 1.5ml 入れ 9,000 rpm 5 分で遠心し菌体回収した。回収は 2 回行った。Solution I (50mM Glucose、25mM Tris-HCl pH 8.0)、10mM EDTA pH8.0) 100 µl を加えボルテックスにかけて混合し、Solution II (0.2N NaOH、1% SDS) 200 µl を加え、優しく混合後、氷上で冷却した。Solution III (3M Potassium acetate、11.5% Glacial acetic acid) 150 µl を加え、優しく混ぜ、3~5 分氷上で放置した。12,000 rpm 4°C で 5 分遠心後、新しいエッペンに水相を回収した。等量の Phenol/Chloroform を加え、ボルテックス後、1,200 rpm、室温、5 分遠心した。上清みを新しいエッペンに回収し、2~2.5 倍量の 100% Ethanol を加え、ボルテックス後、12,000 rpm、室温、10 分遠心し、上清を除去した。70% ethanol を 50µl 加えた。12,000 rpm で室温、1 min 遠心し、上清除去後、真空乾燥させた。乾燥を確認したら 50µl TE (in RNase : final 20µg/ml) を加え DNA を溶解させた。電気泳動により抽出したプラスミド DNA を確認した。

3.6.8 DNA 配列解析

DNA シークエンスには BigDye terminator v3.1 Cycle sequencing Kit (ABI) を用いてダイデオキシ PCR を行い、DNA シークエンサー (福井大学松岡キャンパスバイオ実験機器部門) で解析した。

Reaction mix 1µl、5x buffer 1.5 µl、primer (2pmol/ul) 0.6 µl、鋳型 DNA (200ng) 1.0 µl、滅菌水 5.9 µl を混合し、サーマルサイクラーにセットし、以下の様に反応させた。96 °C 1 分 1 サイクル、96°C 10 秒 50°C 5 秒 60°C 4 分 を 30 サイクル後 4°C に冷却した。1.5ml チューブに反応液を移し、125mM EDTA (pH8.0) と 3M 酢酸ナトリウム (pH5) をそれぞれ 1µl 加える。25 µl の 100% EtOH を加えた。4°C で 15 分保温し、15,000rpm、4°C、20 分で遠心分離し、上清を捨てた。70% EtOH 50 µl を加え、15,000rpm、4°C、5 分 遠心した。上清除去後、ペレットを乾燥させ、15µl の Hi-Di formamide を加え、ペレットを溶解させた。(ピペッティング、またはボルテックス) 95°C、3 分 のインキュベーションを行い、直ぐに氷水で冷却した。パラフィルムで保冷剤に巻き付け、袋に入れ、『DNA シークエンサ使用書』と『Sequence 発注フォーム』と共に学内便の封筒に入れ、『松岡キャンパス バイオ実験機器部門 吉村龍明先生』宛に送付した。

3.6.9 出芽酵母の形質転換法

5 ml の YPD 培地で濁度 (OD_{600})=0.7 まで培養した。15 ml 用チューブに移して、3,000 rpm、室温で 5 分遠心。上清を捨て、5 ml 1xTEL (1M LiOAc、100m M Tris-HCl (pH7.5)、10m M EDTA (pH8.0)) を加え、ボルテックスした。室温で 30 分間混和後、3,000 rpm、室温で 1 分遠心した。上清を捨て、1xTEL 500 μ l で菌体を溶解し、1.5ml エッペンチューブに移した。1 μ l の ssDNA と適量の形質転換したい DNA (1-10 μ l) を加え、ピペッティングし、500 μ l 70% PEG-4000 を加え、ピペッティングした。室温で 60 分静置した。120 μ l の DMSO を加え、42 $^{\circ}$ C で 5 分間熱ショックを与えた。5,000 rpm 室温で 1 分遠心し、上清を除く。900 μ l の滅菌水を加え、5,000 rpm、室温で 3 分遠心した。非薬剤培地に塗布する場合、上清を 800 μ l 除き、残りを YMD (アミノ酸選択培地) に塗布した。G418 や 5-FOA などの薬剤培地に塗布する場合、上清をすべて取り除き、900 μ l の YPD 培地を加えた。2 時間混和後、3,000 rpm 室温で 3 分遠心し、上清を 800 μ l 取り除き、YPD (薬剤培地) に塗布し、30 $^{\circ}$ C で 2~3 日培養した。

3.7 RNA 実験

3.7.1 *S.cerevisiae* からの RNA 抽出

S.cerevisiae からの RNA 抽出は Hot phenol 法で行った。YPD 培地 5 ml に酵母を 30 $^{\circ}$ C で培養した。 OD_{600} =0.7 まで培養し、培養液を 15 ml チューブに移し、3,500 rpm、室温で 3 分遠心し、上清除去。1 ml の DEPC'd water (0.05% DEPC を加え、一晩放置後、60 分 121 $^{\circ}$ C でオートクレーブ) で再懸濁。1.5 ml エッペンに移した。6,000 rpm 4 $^{\circ}$ C で 1 分遠心し、上清除去。必要であれば液体窒素で凍結して -80 $^{\circ}$ C で保存した。

回収した菌体を 400 μ l の AE buffer (50ml NaOAc pH 5.3、10nM EDTA) に再懸濁後、40 μ l の 10% SDS (SDS を DEPC'd water で溶解させる) を加え、440 μ l の AE buffer で平衡化したフェノール (フェノールと等量の AE buffer で一晩攪拌) を加えた。65 $^{\circ}$ C、4 min インキュベートした。インキュベート中は 1 分ごとにボルテックスで攪拌した。インキュベート後すぐに氷水で冷やし、14,000 rpm、4 $^{\circ}$ C で 5 分遠心し、水相を新たなエッペンチューブに回収した。等量の AE buffer で平衡化したフェノールクロロホルムで 2 回抽出した。14,000 rpm、4 $^{\circ}$ C で 5 分遠心し、上清を新たなエッペンチューブに回収後、回収した上清の 10 分の 1 量の 3 M NaOAc と 2~2.5 倍量の 100% エタノールを加えた。-20 $^{\circ}$ C で 20 分冷やした。14,000 rpm、4 $^{\circ}$ C で 5 分遠心した。上清を除去し、70% EtOH 50 μ l を加えた。14,000 rpm、4 $^{\circ}$ C で 5 分遠心し、上清除去後、真空乾燥。50 μ l の DEPC'd に溶かし、電気泳動により濃度と分解度を確認した。吸光度計により 260 nm の波長を測定し (2 μ l)、濃度を算出した。

3.7.2 RNA 中による DNA の分解 (DNase 処理)

RNA サンプルから DNA を除去する為に、DNase 処理を行った。DNase 処理には Deoxyribonuclease (RT Grade) for Heat Stop (NIPPONGENE code No. 312-05951) を用いた。Total RNA 2 μ l、10 x DNase (RT Grade) buffer II 5 μ l、Deoxyribonuclease (RT Grade) 1 μ l DEPC'd water 42 μ l を混合後、37 °C、15 min インキュベート (延長しない事) した。5 μ l の Stop solution を加え、70 °C、10 min インキュベートした。インキュベート後氷上に静置。

3.7.3 逆転写

RNA の逆転写には、High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (ABI part No. 4368814) を用いた。以下の組成で混合した。10 x RT buffer 2 μ l、25 x dNTPs 0.8 μ l、10 x RT Random Primers 2 μ l、MultiScribe™ Reverse transcriptase 1 μ l、DEPC'd water 4.2 μ l を混合した。混合液に 10 μ l の DNase 処理済み RNA サンプルを加え混合した。以下の様にインキュベートした。25 °C 10 分、37°C 120 分、95°C 5 分後 4°C で保温した。

3.7.4 rPCR による転写量解析

転写量解析には、リアルタイム PCR 法を利用した。反応試薬には Applied Biosystem の Power SYBR Green Master Mix を使い、Step One Real Time PCR System を利用して解析を行った。手順を以下に示す。逆転写により合成した cDNA を滅菌水で 10 倍希釈後、希釈した cDNA 5 μ l、5 μ M each primer set 3.6 μ l、2 x reaction buffer 10 μ l、滅菌水 1.4 μ l を混合した。以下の様にインキュベートした。95°C 10 分 1 サイクル、95°C 15 秒 60°C 1 分を 40 サイクル、Dissociation Stage で T_m 値測定。データ解析を行った。Ct 値 (蛍光強度 (DNA 量)が閾値に達したサイクル数) から転写量を算出した。

$2^{-(Ct_{\text{target}} - Ct_{\text{internalcontrol}})}$ によって内部コントロール遺伝子と目的遺伝子の転写量の差を算出し、それを目的遺伝子の転写量とした。

3.7.5 DNA マイクロアレイ

試薬は GeneChip® 3' IVT Express Kit (Affymetrix)、アレイは GeneChip® Yeast Genome 2.0 Array (Affymetrix, Cat.No.4210269) を使用した。複数サンプルの混合液をまとめて作成する場合、5% 過剰量で混合した。以下にプロトコルを示す。

RNA サンプルはホットノール法により抽出した。RNA サンプルを 100ng/μl となるよう希釈した。Poly-A RNA コントロールを 100ng/μl となるよう希釈し、以下の組成で混合した。Total RNA sample (200ng) 2 μl、Dilution Poly-A RNA Controls (200ng) 2 μl、Nuclease-free Water 1 μl を混合した。これを Total RNA/Poly-A RNA Control Mixture とした。

一本鎖 cDNA 合成 (RT) について。以下の組成で Muster Mix を調製した。First-Strand Buffer Mix 4 μl、First Strand Enzyme Mix 1 μl を混合した。nuclease-free PCR tube に 5μl ずつ分注した。Total RNA/Poly-A RNA Control Mixture を 5μl 加えた (Total 10μl)。42°C、2h 反応させた。

二本鎖 cDNA 合成。以下の組成で Muster Mix を調製した。Nuclease-free Water 13 μl、Second-Strand Buffer Mix 5 μl、Second-Strand Enzyme Mix 2 μl を混合した。各サンプル (10μl) に混合液 20μl を加えた。16°C で 1 時間インキュベート後 65°C で 10min 反応した。

ラベル化された cRNA 合成。以下の組成で Muster Mix を調製した。IVT Biotin Label 4 μl、IVT Labeling Buffer 20 μl、IVT Emzymer Mix 6 μl を混合した。各サンプルに混合液を 30μl 加え、40°C で 16h インキュベートした。

cRNA 精製。以下の組成で Muster Mix を調製した。RNA Binding Beads 10 μ l、cRNA Binding Buffer Concentrate 50 μ l を混合した。各サンプルに混合液 60 μ l を加え、各サンプルを U 底プレートに移した。各サンプルに 100% Ethanol 120 μ l を加え、穏やかに 2 分間以上攪拌してよく混合した (cRNA がビーズに結合する)。プレートをマグネットスタンドに移し、5 分間マグネットビーズを吸着させた。マグネットビーズを吸い上げないように上清を注意深くすって捨てた。マグネットスタンドからプレートを取り外した。各サンプルに cRNA Wash Solution 100 μ l を加え、穏やかに 1 分間攪拌した。マグネットビーズを吸い上げないように上清を注意深くすって捨てた。マグネットスタンドからプレートを取り外し、もう一度繰り返した。ビーズに残存している Ethanol を揮発させるために、プレートを 1 分間強く攪拌した。各サンプルに予め 60°C に温めておいた cRNA Elution Solution 50 μ l を加え、プレートを 3 分間強く攪拌した。攪拌後ビーズが完全に分散していることを確認した。プレートをマグネットスタンドに移し、RNA Binding Beads を吸着させた。cRNA を含んだ上清を nuclease-free PCR tube に移し、cRNA の濃度および純度を測定した。

ラベル化された cRNA の断片化。cRNA 7.5 μ g を加え、5x Array Fragmentation Buffer 4 μ l、Nuclease-free Water で全量 20 μ l にした。94°C、35 分間。反応後、サンプルをすぐに氷上に移した。

ハイブリダイゼーション。以下の組成でハイブリダイゼーションカクテルを調製した。Fragmented and Labeled aRNA 13.3 μ l、Control Oligonucleotide B2 (3nM) 1.7 μ l、20xHybridization Controls 5 μ l、2xHybridization Mix 50 μ l、DMSO 10 μ l、Nuclease-free Water 20 μ l を混合した。使用前にアレイを室温に戻した。ハイブリダイゼーションカクテルをヒートブロックで 99°C、5 分間加熱した。それと同時に、アレイ内に Pre-Hybridization Mix を septa の片側を通じて注入した。アレイをオープン内で回転させながら 45°C、10 分間インキュベートした。ハイブリダイゼーションカクテルを 45°C に設定したヒートブロックに移して 5 分間インキュベートした。カクテルを遠心機の最高回転数で 5 分間遠心して、不溶物を沈殿させた。アレイをオープンから取り出し、Pre-Hybridization Mix を抜き取った。チューブの底にある不溶物を入れないように、適量のカクテルをアレイに注入した。アレイを 45°C に設定したオープンに入れ、60rpm で回転させた。16 時間のハイブリダイゼーションを行った。データを取得し解析した。

3.8 タンパク質実験

3.8.1 WESTERN BLOTTING の sample 調製

本実験は常に手袋を着用し、4℃で行った。

酵母を YPD もしくは YMD 液体培地で培養した。YPD 培地の場合、 OD_{600} ~2.0 で菌体を 1.5 ml 回収した。YMD 培地の場合、 OD_{600} =0.6-0.7 で菌体を 3 ml 回収した。4℃、6000 rpm、3 分で遠心した。上清を除去し、氷冷した 1xPBS 1ml に溶かし、エッペンに移した。6000rpm 4℃で 1 分遠心した。上清を除去し、ペレットを 2×SDS sample buffer に溶かした (YPD の場合 50ul、YMD の場合 30ul)。サンプルを 95℃ 3 分でボイルし、すぐに氷冷した。これを 1xsample とした。-20℃保存ならばしばらく保存可能となる。

3.8.2 SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE)

融合タンパク質の発現を確認するために SDS-PAGE を行った。以下に手順を示す。ゲル版を組み立て、適当な濃度の Lower Gel 用溶液を作り重合させた。静かに蒸留水を重層し、ゲルが固まったら蒸留水を捨てた。Upper Gel 用溶液を作り重合させ、コームを差し込んだ。

ゲル板からシリコンチューブとコームをはずし、電気泳動装置にセットし、Running Buffer を入れた。サンプルをアプライし、最初 10 mA (ゲル 1 枚あたり) で電気泳動した。サンプルの流れが安定するのを確認したら、20 mA (ゲル 1 枚あたり) に上げた。サンプルがゲルの下方まで流れたら、泳動を終了した。ゲル板をスパチュラではずし、ゲルを取り出した後、ゲルを振とうしながら CBB 染色液で 30 分間染色した。染色液を捨て、濃い液 (MeOH 50%, 酢酸 10%) で 5 分ずつ 3 回洗浄した。濃い液で 15 分洗浄した (キムワイプを入れておく)。薄い液 (MeOH 10%, 酢酸 10%) で O/N 洗浄した (キムワイプを入れておく)。脱色後、SDS-PAGE の結果をスキャナーで取り込んだ。

3.8.3 ウェスタンブロッティング

目的の融合タンパク質の発現をウェスタンブロッティングにより確認した。手順を以下に示す。

SDS-PAGE 後、泳動後ゲル、スポンジ、ろ紙を transfer Buffer (Tris 40m、Glycine 300mM、30% メタノール、10% SDS) に浸した。タッパー内で PVDF メンブレンをメタノールに浸し、直ぐに捨て、蒸留水を加えた。5 分以上経過したら Transfer buffer に浸した。トランスファー装置にセットし、400mA で 1 時間トランスファーした。PVDF メンブレンを 1%アミドブラックで 10 秒間染色した。PVDF メンブレンから色素が抜け出さなくなるまで蒸留水で洗浄した。ブロッキング溶液 (5% スキムミルク in TBS-T (25mM Tris-HCl pH7.5、150mM NaCl、0.2% Tween 20)) で 30 分以上インキュベート (O/N でも可) した。一次抗体溶液中 (抗 Flag 抗体 HRP の場合ブロッキング溶液で 5,000 倍希釈、抗 G196 抗体の場合 2,000 倍希釈、抗 Ada1 抗体の場合 1,000 倍希釈) で 1 h インキュベートした (O/N で可)。TBS-T 溶液で 10 分 3 回洗浄した。二次抗体溶液中 (抗ラビット抗体の場合 TBS-T で 20,000 倍希釈、抗マウス抗体の場合 10,000 倍希釈)で 30 分インキュベートした。TBS-T 溶液で 10 分 3 回洗浄した。メンブレンを撮影用ケースに移し、発色基質溶液 (immunoStar LD(wako) Solution A 200 μ l、Solution B 200 μ l を混合)を滴下した。撮影装置に入れ撮影した。

3.8.4 FLAG Purification

すべての操作は on ice で行った。すべての遠心、ローテートは特記しない限り 4°C または低温室で行った。すべての溶液は特記しない限り氷冷したものを用いた。すべての試薬に対し、以下のプロテアーゼインヒビターを添付した。0.2M PMSF (in EtOH) 4 μ l/1ml、5mg/ml Pepstain A (in DMSO) 1 μ l/5ml、5mg/ml Leupeptin (in H₂O) 1 μ l/5ml。

300ml の YPD 培地で OD₆₀₀=2.0 まで培養した (30°C、100-200rpm)。菌体を 50ml チューブに 50ml 移し、3,000 rpm 2 分で遠心し上清を除去した。これを培養液がなくなるまで繰り返した。ペレットに 1xPBS を 20ml 加えて再懸濁した。3,000 rpm 2 分で遠心し、上清を除去した。必要であれば液体窒素で凍結して-80°C 保存した。菌体ペレットを細胞破砕機でパウダーになるまで破砕した。(約 3-5ml のペレットの場合、1500rpm、7 分) 菌体パウダーを 15ml チューブに回収した。必要であれば液体窒素で凍結して-80°C 保存した。

菌体パウダーに Lysis buffer (50mM HEPES-KOH pH7.5、300mM KCl、10% グリセロール、0.05% Tween-20、0.005% NP-40、2mM β -glycerophosphate、2mM NaF、0.4mM Na₃VO₄、0.5mM Na-pyrophosphate) を 1.4 ml 加えた。時折ボルテックスしてパウダーを溶かした。14,000rpm、30min 遠心した。上清を新しいエッペンに回収した。14,000rpm、20min 遠心し、上清を新しいエッペンに回収した。14,000 rpm で 20 分遠心し、上清を新しいエッペンに回収した。(超遠心を用いる場合、15ml チューブからエッペンに上清を移し、40,000 rpm 30 分遠心後、上清を新しいエッペンに回収する。)

Sepharose-4B の平衡化。1.5ml エッペンに 100 μ l の Sepharose-4B をとり、1ml の lysis buffer + 5mg/ml BSA を加え、3,000 rpm 1 分で遠心し、上清を捨てた。これを後 2 回繰り返した。菌体抽出後の上清を 100 μ l の平衡化済み Sepharose-4B の入った 1.5ml エッペンに移動し、1 時間ローテーターで混和した。3,000rpm で 1 分遠心した。

Anti-Flag agarose の平衡化。1.5ml エッペンに 30 μ l の anti-Flag-agarose をとり、500 μ l の lysis buffer + 5mg/ml BSA を加え、3,000 rpm 1 分で遠心し、上清を捨てた。これを後 2 回繰り返した。Sephacryl S4B 後の上清を 30 μ l の平衡化済み anti-Flag-agarose の入った 1.5ml エッペンに移し、3h、ローテーターで混和した。3,000 rpm、1 分で遠心し、上清を廃棄した。lysis buffer + 0.1mg/ml BSA 100 μ l を用いて新しいエッペンに移した。lysis buffer + 0.1mg/ml BSA 500 μ l を新しいエッペンに入れておいた。anti-Flag-agarose の入ったエッペンに lysis buffer + 0.1mg/ml BSA 500 μ l を加えた。ピペティングし、混合液を別の新しいエッペンに移した。用いたチップのままエッペンに入れておいた lysis buffer + 0.1mg/ml BSA 500 μ l を anti-Flag-agarose が元々入っていたエッペンに加え、ピペティングした。そのまま lysis buffer + 0.1mg/ml BSA 500 μ l を anti-Flag-agarose の入っているエッペンに加えた。3,000rpm、1 分遠心し、上清を除去した。anti-Flag-agarose に 1ml の lysis buffer + 0.1mg/ml BSA を加えた。3,000rpm、1 分遠心し、上清を除去した。この操作をもう一度繰り返した。anti-Flag-agarose に 1ml の lysis buffer + 0.1mg/ml BSA 加え、30 分間ローテーターで回して洗浄した。この操作をもう一度行った。anti-Flag-agarose を 1ml の lysis buffer + 0.1mg/ml BSA で新しいエッペンに移し、一晚ローテートして混和した。

anti-Flag-agarose に lysis buffer 1ml を加えた。3,000 rpm 1 分遠心し、上清を除去した。この操作を後 2 回繰り返した。anti-Flag-agarose に lysis buffer 1ml を加え、30 分ローテーターで混和した。3,000 rpm 1 分で遠心し、上清を除去した。anti-Flag-agarose を lysis buffer 1ml で新しいエッペンに移し、3,000 rpm 1 分で遠心し、上清を除去した。anti-Flag-agarose に lysis buffer 1ml を加え、30 分ローテーターで混和した。3,000 rpm 1 分で遠心し、上清を除去した。anti-Flag-agarose と等量の Elution buffer (100 μ g/ml Flag peptide in Lysis Buffer) を加え、2 時間ローテートして混和した。溶液を anti-Flag-agarose ごとカラムに移し 3,000rpm 1 分遠心後カラムを回転させて 3,000rpm 2 分遠心した。必要に応じて以下の操作を行う。

エタノール沈殿による濃縮。サンプル体積の 2-2.5 倍量のエタノールを加え、-80 $^{\circ}$ C で 1 時間沈殿を成熟させた。14,000rpm、20 分遠心した。適量の 1xSDS sample buffer で再溶解した。

SDS sample buffer での電気泳動サンプル調製。使用したいサンプル体積の 1/4 の 5xSDS sample buffer と混合した。95 $^{\circ}$ C、5 分インキュベートした。氷上で急冷後、電気泳動まで -20 $^{\circ}$ C で保存した。

3.9 クロマチン免疫沈降法 (Chromatin Immunoprecipitation)

ChIP 法は菌体回収から目的タンパク質の免疫沈降、RT-qPCR による局在領域の解析まで、約 4 日間にわたり実験操作を行った。

1 日目は菌体を三角フラスコで培養し (30°C、200rpm)、OD₆₀₀ = 1.5 の 600ml の菌体含有培地を回収した。室温 4500rpm 5min 遠心し、上清除去後、Cross linking buffer 100 ml でペレットを懸濁した。パラホルムアルデヒドを最終濃度 1% となるように添加後、室温で 30 分間振とうした。2.5 M Glycin を 5 ml 加えて 5 min 振とうした。室温 4500rpm 5min 遠心し、上清除去。Wash buffer 50 ml / DTT 150 µl でペレットを懸濁後、再度室温 4500rpm 5min 遠心し、上清除去後、氷上で冷却。Spheroplast buffer 10 ml / DTT 10 µl でペレットを懸濁。10% SDS 1 ml にサンプル 30 µl を溶かし OD₆₀₀ 測定 (OD₆₀₀ = 0 は 10% SDS 1 ml に Spheroplast buffer 30 µl を溶かしたもの)。10 mg/ml Zymolyase-100T を 200 µl 加え、サンプル OD が 1/10 となるまで振とうした。Pipes / Sorb buffer 20 ml を加えて優しく混和した。3,000 rpm 4°C 5 min 遠心して、回収、上清除去。以下の操作は全て氷上で迅速に行う。

PBS 5ml / PMSF 12.5 µl を加え、すばやくペレットを溶かした。3,000 rpm 4°C 5 min 遠心し、上清除去。HEPES / TritonX-100 5 ml / PMSF 12.5 µl / Leupeptin 1 µl / Pepstatin 1 µl で再懸濁。4,000 rpm 4°C 7 min 遠心し、上清除去。HEPES / NaCl 5 ml / PMSF 12.5 µl / Leupeptin 1 µl / Pepstatin 1 µl で再懸濁。4,000 rpm 4°C 7 min 遠心し、上清除去。SDS Lysis buffer 400 µl / PMSF 4 µl / Leupeptin 2 µl / Pepstatin 2 µl で再懸濁。全量が 4 mL になるように IP Dilution buffer を加え、よくピペッティングした。サンプルを 15 mL Tube に 1 mL 分注後、High power 10 sec Sonication + 20 sec Resting / set として 10 set 連続でソニケーションを行った。ソニケーションしたサンプルを 15ml チューブにまとめてクロマチンサンプルとした。

2 日目は免疫沈降 (IP) を行うため、初めにビーズの平衡化を行った。1.5ml エッペンに Protein A/G beads を 20 µl と 30 µl 分注し、Protein A/G beads blocking buffer を 250 µl 加えた。3000 rpm 4°C 1 min 遠心し、上清除去。再度、Protein A/G beads blocking buffer を 250 µl 加え、3000 rpm 4°C 1 min 遠心後、上清除去。

IP を行うためクロマチンサンプル 900 µl を 14,000 rpm 4°C 5 min 遠心し、上清回収。非特異的に結合するものを減らすため、平衡化したビーズ 20 µl を加え、混ぜた。4°C で 30 min 振とう後、3000 rpm 4°C 1 min 遠心し、上積を回収。平衡化したビーズ 30 µl を加え、タンパク質抗体 を 14,000 rpm 4°C 5 min 遠心後 3 µl 加えた。4°C で 6 hours 以上 振とう。

3日目はIPサンプルを回収した。IPサンプルを洗浄するため、3000 rpm 室温 1 min 遠心後上清除去。TSE-150 を 950 μ l 加え、3 min 振とう後、3000 rpm 室温 short 遠心し、上清除去。TSE-500 を 950 μ l 加え、3 min 振とう後、3000 rpm 室温 short 遠心し、上清除去。LiCl/Detrigent Wash (LiDW) を 950 μ l 加え、3 min 振とう後、3000 rpm 室温 short 遠心し、上清除去。TE を 950 μ l 加え、3 min 振とう後、3000 rpm 室温 short 遠心し、上清除去。TE を 600 μ l を用いて、ビーズを新しいエッペンに移す。3 min 振とう後、3000 rpm 室温 short 遠心し、上清除去。SDS / NaHCO₃ 250 μ l を加える。15 min 振とう後、3000 rpm 室温 short 遠心し、上清を新しいエッペンに移した。上積を回収したエッペンに SDS / NaHCO₃ 250 μ l を加え、15 min 振とうし、3000 rpm 室温 short 遠心後、上清を先ほどのエッペンに回収。5M NaCl を 20 μ l 加えボルテックス。65°C で 4~6 hour インキュベート。

Proteinase K 処理により、クロマチンサンプルのタンパク質を分解させた。IP サンプルに対して、1ml の 100 % エタノールを加え、-80°C で 15 min。14,000 rpm 4°C 10 min 遠心し、上清除去。70 % エタノール を 100 μ l 加え、14,000 rpm 4°C 10 min 遠心後、上清を除去し、真空乾燥。乾燥後、TE 100 μ l を加えピペッティング。

以後はIPサンプルだけでなく、total サンプル (100 μ l のクロマチンサンプル) にも同じ操作を行う。5×Protein K buffer を 25 μ l 加えた。Proteinase K (20 mg/ml) を 1.5 μ l 加えた。42 °C 1~2 hours インキュベート。TE を 175 μ l 加えた。等量のフェノールクロロホルム を加え、ボルテックス。14,000 rpm 室温 5 min 遠心し、上清をエッペンに移した。等量クロロホルムを加え、ボルテックス。14,000 rpm 室温 5 min 遠心し、上清をエッペンに移した。Glycogen (20 mg/ml) を 1 μ l 加えた。1/10 の量の 3M NaOAc を加えた。2 倍量の 100 % エタノールを加えた。-20 °C overnight。14,000 rpm 4°C 15 min 遠心後、上清除去。70 % エタノールを 100 μ l 加えた。14,000 rpm 4°C 5 min 遠心。上積除去して、真空乾燥。total のサンプルには、TE 100 μ l を加え、IP のサンプルには、TE 20 μ l を加えた。RNase (1 Ug/ μ l) を 1 μ l を加えた。42 °C 1 hours。-20 °C 保存。

4日目はプレートリーダーを用い IP サンプルの DNA 濃度の決定と、RT-qPCR による局在量解析を行った。PicoGreen は TE buffer を用い 1/200 に希釈した。濃度の異なる λ DNA に PicoGreen 100 μ l を加えコントロールサンプルとした。TE buffer 95 μ l に 1/200 ~ 1/3200 に希釈した total サンプル 5 μ l または IP サンプル 5 μ l を加え PicoGreen 100 μ l を加えた。プレートリーダーにかけて、 λ DNA で検量線を作製した。サンプルの濃度を計算した。

プレートリーダーの結果を基に、total と IP の濃度をそろえ、標的領域のプライマーセットを使用し、RT-qPCR により局在量を測定した。局在量は以下の計算式で算出した。

(領域 x における IP タンパク質の局在量)

$$=2^{\{C_T(\text{input}\cdot x)-C_T(\text{IP}\cdot x)\}}/2^{\{C_T(\text{input}\cdot \text{TEL}0.5)-C_T(\text{IP}\cdot \text{TEL}0.5)\}}$$

3.10 顕微鏡観察

顕微鏡観察では、サンプル酵母を前日に前培養し、実験当日に OD (600nm)= 0.05 で培養を開始し、対数増殖期中期 (OD (600nm)= 0.4) で菌体を回収した。回収した菌体 5 μ L をスライドガラスにとり、上からカバーガラスをのせた。菌体が漏れないように、カバーガラスの周囲をペディキュアによりシール処理し、顕微鏡にて菌体を観察した。

画像は明視野画像の他に、必要に応じて EYFP と mCherry の蛍光画像を撮影した。

画像解析は ZEN 2.3 (blue edition) (Carl Zeiss) ソフトを使用した。各細胞内の EYFP 最大輝度 (EYFP in cell max) と mCherry 最大輝度 (mCherry in cell max)、無細胞領域の EYFP 最大輝度 (EYFPBG max) と mCherry 最大輝度 (mCherry BG max) を測定し、以下の式で *IMD2* の発現量を算出した。

$$IMD2 \text{ expression} = \frac{EYFP_{max}^{in \ cell} - EYFP_{max}^{BG}}{mCherry_{max}^{in \ cell} - mCherry_{max}^{BG}}$$

3.11 一細胞追跡実験

顕微鏡観察では、サンプル酵母を前日に前培養し、実験当日に OD (600nm)= 0.05 で培養を開始し、対数増殖期中期 (OD (600nm)= 0.4) で菌体を回収した。回収した菌体 1000 倍希釈し、一細胞追跡用のサンプルとした。

菌体は Y04C プレートにトラップ後、CellASIC ONIX2 を用い、流速 2psi で培地を流し続けることで、培養した。必要に応じて、培地に MPA、NAM、Guanine 等の薬剤を添加した。

撮影は ZEN 2.3 (blue edition) (Carl Zeiss) ソフトを使用し、タイムラプス画像撮影モードで撮影を行った。初めに明視野及び蛍光画像を撮影後、明視野画像を 5 分ごとに、蛍光画像を 15 分間隔で最大 12 時間撮影を行った。

多点撮影はタイルセットアップより、撮影したい位置を記録し、最大で 8 点選択し、各時間で全位置の撮影を行った。

撮影画像の解析では ZEN 2.3 (blue edition) (Carl Zeiss) ソフトを用い、初めに蛍光画像の撮影データを抽出し、タイムステッチにより撮影位置ごとにデータを分割した。初めの一細胞を 1 番として新しく生まれた細胞に番号を付けていき、追跡が終了するまでの各細胞の輝度を測定した。各細胞内の EYFP 最大輝度 (EYFP in cell max) と mCherry 最大輝度 (mCherry in cell max)、無細胞領域の EYFP 最大輝度 (EYFP BG max) と mCherry 最大輝度 (mCherry BG max) を測定し、以下の式で *IMD2* の発現量を算出した。

$$IMD2\ expression = \frac{EYFP_{max}^{in\ cell} - EYFP_{max}^{BG}}{mCherry_{max}^{in\ cell} - mCherry_{max}^{BG}}$$

動画はタイムステッチ後のデータを元に、ZEN 2.3 (blue edition) (Carl Zeiss) ソフトを用い作成した。

4 実験結果・考察

4.1 第1章 III 番染色体右腕における SAGA-TBP の境界制御機構の解析

4.1.1 Spt3 及び、Spt8 はサブテロメア領域内の遺伝子発現を制御している

我々は境界形成における SAGA-TBP の機能を解析するため、初めに TBP と相互作用する Spt3 及び、Spt8 が影響する領域をマイクロアレイ解析により絞り込んだ

(Fig.1)。WT、*spt3Δ*、*spt8Δ* 株を比較した結果、WT と比較して *spt3Δ*、*spt8Δ* ではテロメア近傍の遺伝子発現が変動していた。また、*spt3Δ* と *spt8Δ* の影響は似ていたが、全体的に *spt3Δ* は *spt8Δ* よりも強く遺伝子発現に影響した。

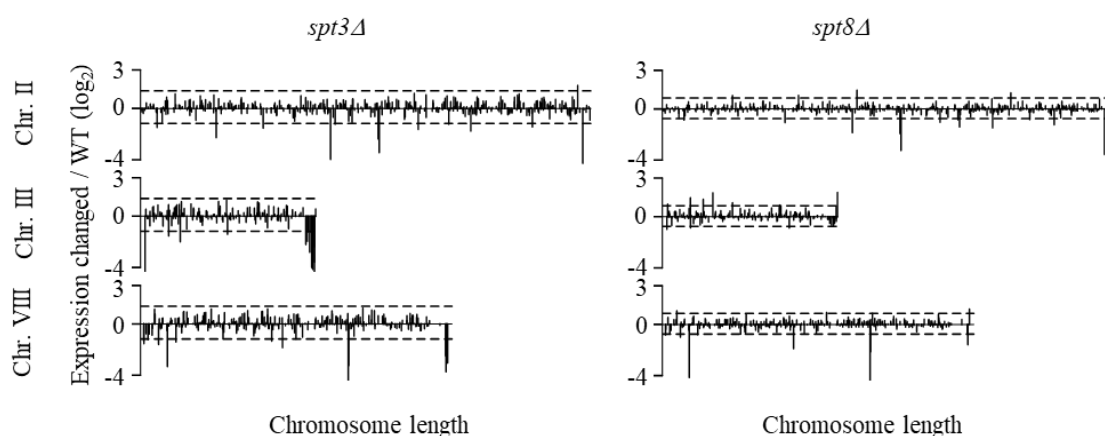


Figure 1. Spt3 and Spt8 regulate subtelomere gene expression. Changes in expression of genes from Chr II, III, and VIII in the *spt3Δ* and *spt8Δ* and the wild type (WT) strains as determined by microarray. Dotted lines show the average ± 2 x standard deviation.

そこで、Spt3/Spt8 の影響がサブテロメア領域に集中しているかを解析した。テロメア末端からの 30kb までをサブテロメア領域として、染色体上の全遺伝子 (5517 遺伝子) を、サブテロメア領域内の遺伝子 (270 遺伝子) と、サブテロメアよりもセントロメア側にある遺伝子の二つに分類し、Spt3/Spt8 の影響を解析した。サブテロメア領域内の遺伝子数は全染色体上の遺伝子数の 5% (270/5517) 程度であるため Spt3/Spt8 がランダムに染色体上に働くならば、WT と比較して影響を受けた全遺伝子中のサブテロメア遺伝子の割合は 5%程度となることが予想された。実際に *spt3Δ* で抑制された遺伝子は 149 遺伝子あったが、その内サブテロメア領域の遺伝子は 46 遺伝子であり、その割合は 30%となった。また *spt8Δ* で抑制された遺伝子の割合は 17% となり、Spt3/Spt8 とともにサブテロメア領域優位に機能していた (Fig 2A)。特に影響の大きな Spt3 に注目し、抑制された遺伝子のオンロジー解析の結果では、ストレス

応答に関わる遺伝子が多く見付き (Fig 2B)、SAGA の標的遺伝子にストレス応答性遺伝子が存在することとも一致していた[51]。以上より、Spt3 及び Spt8 はサブテロメア領域の遺伝子発現制御に重要であることを見出した。

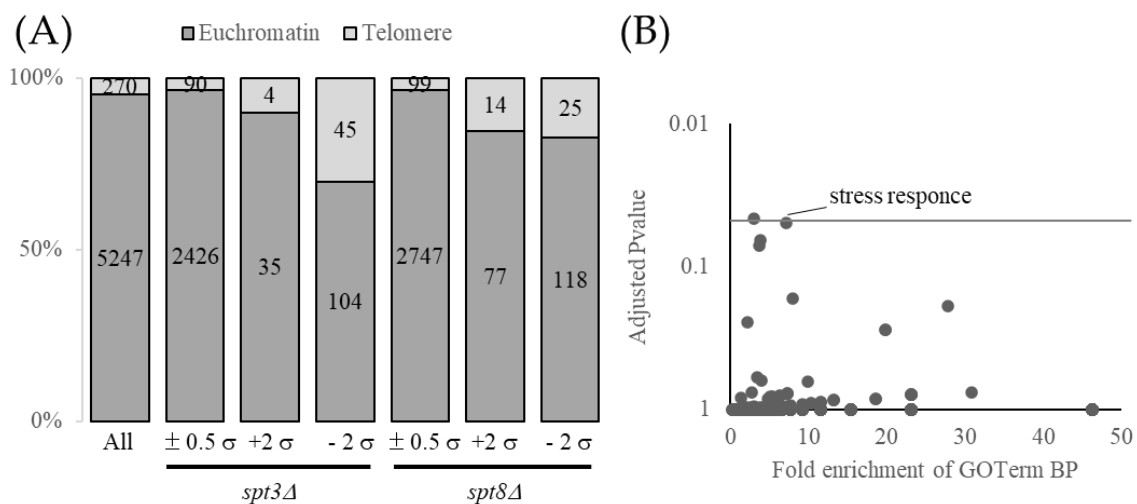


Figure 2. The *spt3Δ* and *spt8Δ* mutants showed a deficit in the silencing boundary. (A) A 100% stacked column chart of microarray analysis of the transcriptome of *spt3Δ* strain and *spt8Δ* strain. The numbers in the bar plot represent gene numbers. σ indicates standard deviation. $\pm 0.5\sigma$, $+2\sigma$, and -2σ indicate unchanged, upregulated, and downregulated genes, respectively, compared to WT. (B) The results of DAVID analysis of downregulated genes in *spt3Δ*. The GO Term biological process (BP) category results were plotted on the x-axis. Fold enrichment means the ratio of the actual number of downregulated genes to the expected number of genes belonging to each term. Adjusted p-values were calculated by the Benjamini method.

4.1.2 Spt3 及び Spt8 はサブテロメア領域の境界制御に関わる

Spt3/Spt8 のサブテロメアにおける機能を解明するため、マイクロアレイ解析結果より、特に影響の大きかった三番染色体右腕のサブテロメア領域 (ChrIIIR) に注目した。ChrIIIR 中の遺伝子群に対する Spt3/Spt8 の影響を確認するため、転写量解析を行った結果、*YCR108C*を除いた遺伝子群では *spt3Δ* や *spt8Δ* により、発現が抑制された。*YCR108C*はテロメアとの距離がとて近いため、常に Sir 複合体により抑制されていると考えられた。この領域の抑制が SAGA の制御か、サイレンシング伸長によるものかを調べるために、*spt3Δ* 及び *spt8Δ* から *SIR3* を欠失させた (図 3B)。二重変異株における Chr IIIR 遺伝子の発現は *sir3Δ* 株と同等であったことから、Chr IIIR 遺伝子の発現抑制は SAGA 複合体による制御ではなく、サイレンシング領域

の伸長によるものであることが示された。

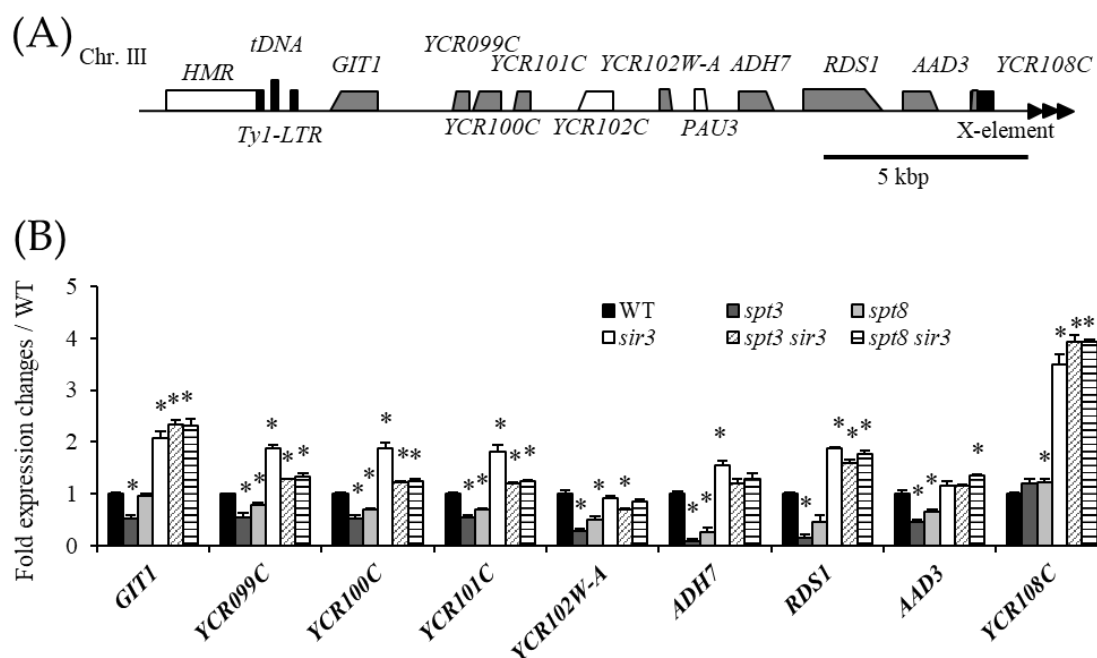


Figure 3. Spt3 and Spt8 are involved in boundary formation. (A) Gene map of Chr III. Grey genes were measured gene expression. (B) Transcription level at Chr III genes in the *spt3Δ* strain and *spt8Δ* strain, and in the *sir3Δ* strain by RT-qPCR. Asterisks mean $p < 0.05$ compared with WT (Student's T-test). Error bars show standard errors calculated from three independent experiments.

4.1.3 Spt3 と TBP の相互作用は境界形成に重要である

Spt3 と Spt8 が Chr III サイレンシング境界の形成に寄与していることが示唆された。特に、*spt3* と *spt8* 株における遺伝子発現パターンは、テロメアの近くに位置する *YCR108C* と、*YCR108C* のすぐ隣に位置する *AAD3* とで明らかに異なっていた (図 3B)。したがって、*YCR108C* と *AAD3* の間には DNA 配列に依存したサイレンシング境界が存在するという仮説を立て、検証するために、*AAD3* と *YCR108C* の間の領域を、通常酵母には存在しないアンピシリン耐性 (*ampR*) 遺伝子配列で置換した株を作製した。*AAD3* と *YCR108C* の間にある *ARS319* 配列が結合体形成に影響を与える可能性を考慮し、*AAD3* から *ARS319* までの領域を置換した Amp-*ARS319* 株と、*AAD3* から *YCR108C* までの領域を置換した Amp-*YCR108C* 株を作製し (図 4A) RT-qPCR を行った。予想に反して、遺伝子間領域への *ampR* 遺伝子配列の挿入は、遺伝子発現に影響を与えなかったため、境界形成によるサイレンシング領域の制御は、Chr III の *AAD3* と *YCR108C* の間の DNA 配列に依存しないことが示された (図 4B)。

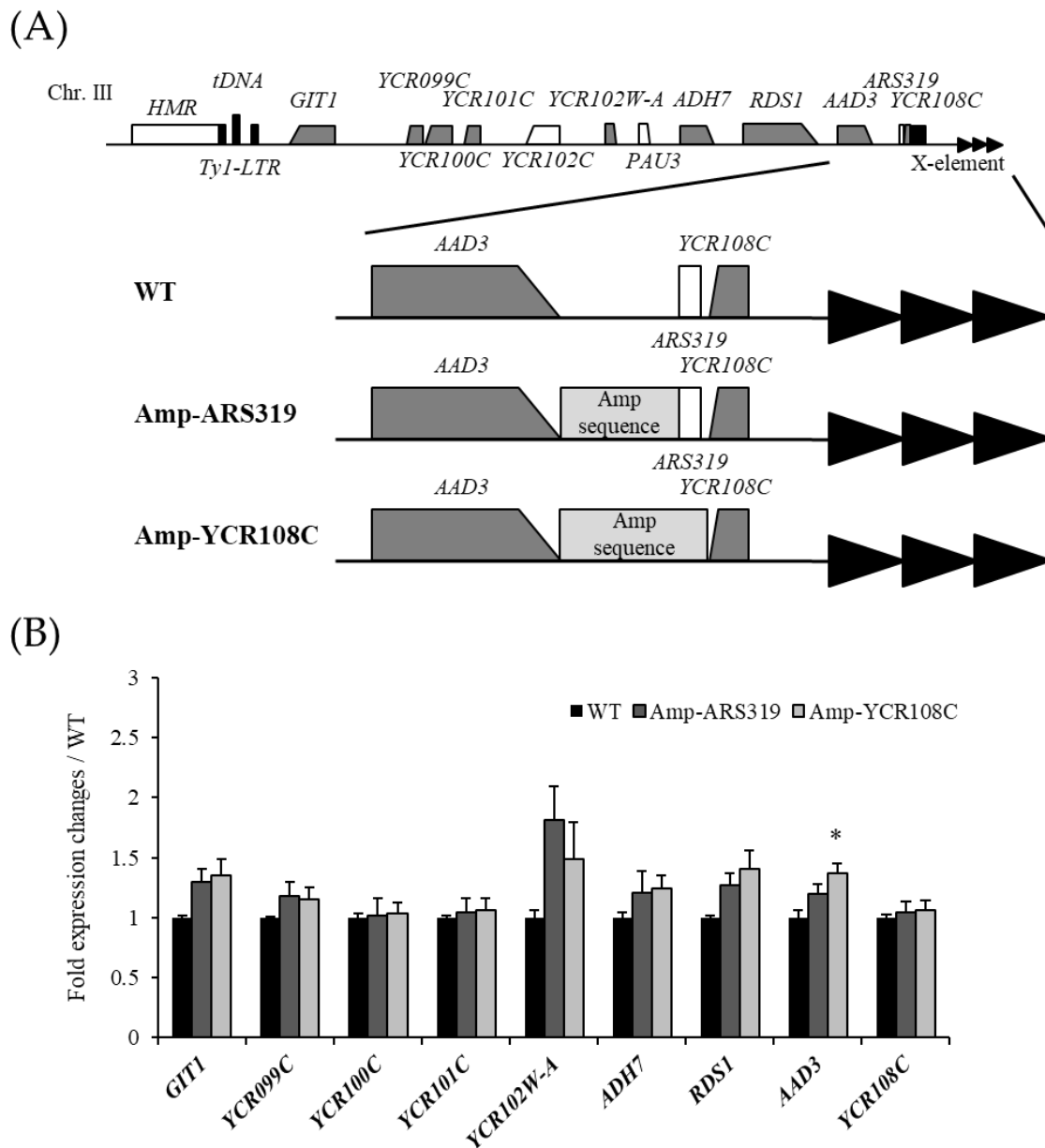


Figure 4. The boundary formation is DNA sequence-independent at the Chr III right telomere. (A) Gene map of Chr IIIIR in Amp-ARS319 and Amp-YCR108C strains. (B) Expression level of Chr IIIIR genes in Amp-ARS319 and Amp-YCR108C strains by RT-qPCR. Asterisks mean $p < 0.05$ compared with WT (Student's T-test). Error bars show standard errors calculated from three independent experiments.

これらの結果と Spt3/8 と TBP の既知の相互作用に基づき、我々は Chr IIIIR の遺伝子の転写が SAGA-TBP によって活性化され、サイレンシング領域の伸長を防いでいると予測した。SAGA-TBP 相互作用が Chr IIIIR の転写制御に及ぼす影響を明らかにするため、SAGA 複合体内の TBP 結合パートナーである Spt3 に注目した。我々は、

TBP との相互作用に影響を与える SPT3 の 2 つの変異が、Chr IIIR の遺伝子転写レベルに及ぼす影響を調べた。最初の Spt3 (Y193C)変異株 (*spt3(Y193C)*) は、TBP との相互作用を減弱させる Spt3 を産生する。逆に、2 番目の Spt3 (E240K)変異株 (*spt3(E240K)*) は、TBP との相互作用が強くなり、TATA ボックスへの TBP のリクルートが減少する[35, 46, 86]。これらの置換はどちらも SAGA-TBP 相互作用に影響を与え、*spt3Δ* と同様に、Chr IIIR の境界を破壊し、遺伝子発現を抑制すると考えられている。予想に反して、*spt3(Y193C)* は遺伝子発現の減少を示さなかった (図 5A)。さらに、*spt3(Y193C)* 株において *SIR3* 遺伝子を欠失させる (*spt3(Y193C) sir3Δ*) と、いくつかの遺伝子の発現レベルは *sir3Δ* 株よりもわずかに高くなった。また、*spt3(E240K) sir3Δ* では、*spt3(Y193C)* とは対照的に、いくつかの遺伝子の転写が低下した。これらの結果は、Chr IIIR のいくつかの遺伝子において、Spt3 の Y193C および E240K 置換の影響が Sir3 タンパク質の存在に依存していることを示していた。

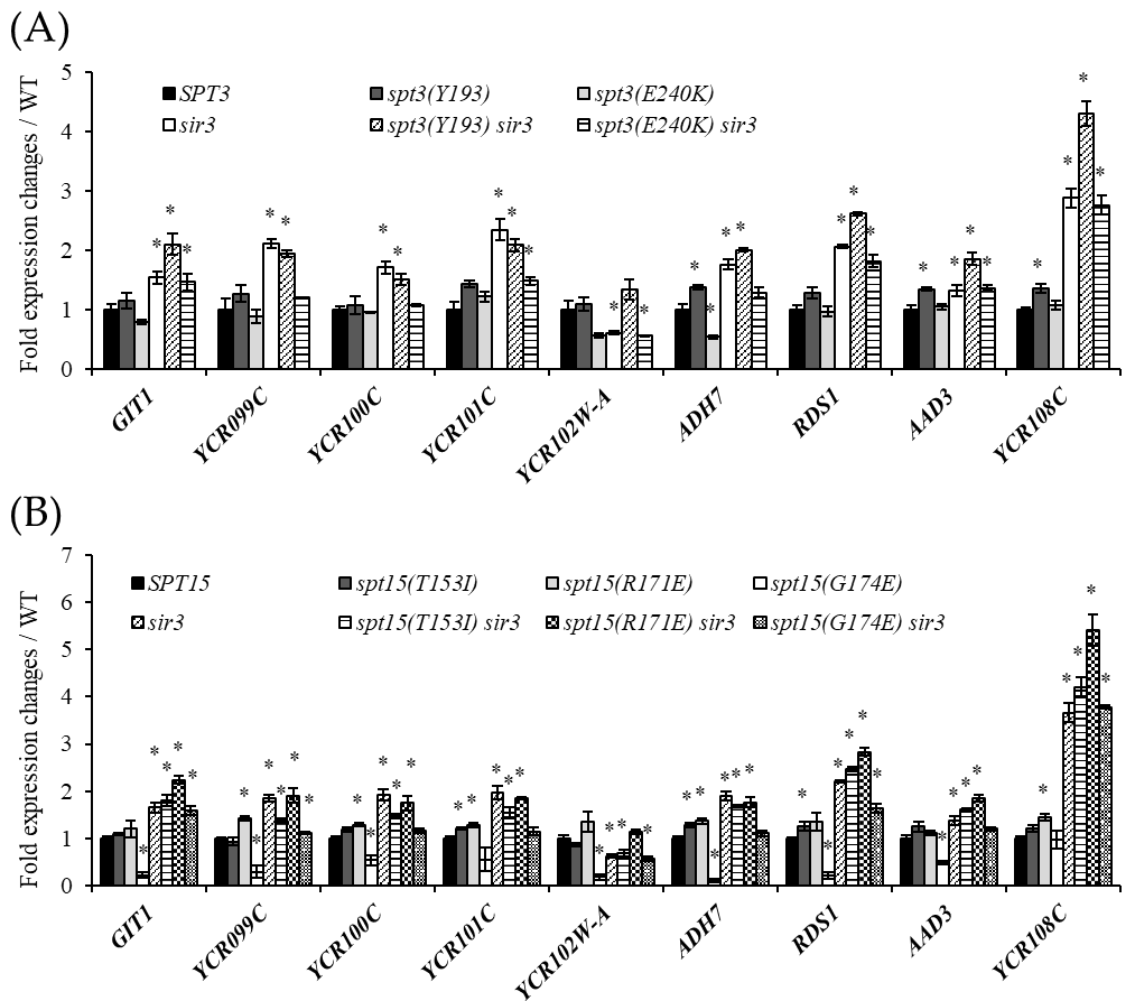


Figure 5. Interaction between Spt3 and TBP is important for boundary formation.

(A), (B) Transcription level at Chr IIIR genes in *spt3* mutant strains and *sir3Δ* strains (A) and in *spt15* mutant strains and *sir3Δ* strains by RT-qPCR (B).

Asterisks represent $p < 0.05$ compared with the WT (Student's T-test). Error bars show standard errors calculated from three independent experiments.

次に、TBP 変異が Chr IIIR の遺伝子に及ぼす影響を解析した。TBP (Spt15) の 3 つのアミノ酸残基置換変異体、T153I、R171E、G174E は、TATA ボックスへの TBP のリクルート、Spt8 との相互作用、Spt3 との相互作用を弱めることが報告されている [46, 54, 87-89]。我々は TBP 変異株 (*spt15(T153I)*、*spt15(R171E)*、*spt15(G174E)*) を用い、SAGA による TBP のリクルート、あるいは Spt3 や Spt8 を介した TATA ボックスへの TBP の移動が境界形成に影響を与えるかどうかを調べるため、Chr IIIR の遺伝子の転写レベルを解析した。*spt15(T153I)* 株と *spt15(R171E)* 株では、WT と同様の傾向を示し、*spt15(T153I) sir3Δ* および *spt15(R171E) sir3Δ* でも *sir3Δ* と同様の結果が得られたことから、TBP のリクルートおよび Spt8 との相互作用は Chr IIIR における境界形成に決定的な影響を与えなかった。しかし、*spt15(G174E)* 変異体では Chr IIIR 領域の遺伝子が有意に抑制されていた。さらに、*spt15(G174E)* の Chr IIIR における遺伝子発現は *sir3Δ (spt15(G174E) sir3Δ)* によって再び回復することが確認された。これらの結果は *spt3Δ* を用いて得られた結果と同様であり、TBP と Spt3 の適切な相互作用が境界形成に重要であることが示された。

4.1.4 SAGA 複合体は境界形成に必要である

以上の結果から、Spt3 と TBP の相互作用が Chr IIIR の境界形成に重要であることや Spt8 と TBP の相互作用が影響しないことが明らかとなった。そこで SAGA 複合体と似ているが、Spt8 を含まず、Spt7 の切断型 (C 末端が切断され、1-1141 アミノ酸残基のタンパク質となる) を含んでいる SLIK 複合体が TBP と相互作用し、この領域の制御に関与するか調べるため、SLIK 複合体のみが存在する酵母株を構築し、Chr IIIR 遺伝子の転写発現を測定した。切断型 Spt7 (SLIK 特異的) の存在を確認するため、C 末端に 3xFlag タグを付加した (SLIK-Flag 株)。SLIK-Flag 株と C 末端に 3xFlag タグを付加した Spt7 を発現する株 (Flag-Spt7 株) から、SAGA と SLIK 複合体を抽出・分画し、抗 Flag 抗体を用いたウエスタンブロッティングにより SAGA と SLIK の複合体のバンドを検出した (図 6A)。SLIK-Flag 株では、Flag-Spt7 の 2 番目のバンドと同じ位置にバンドが検出され、SLIK-Flag 株で SLIK 複合体が形成されていることが確認された。SLIK 株を用いて Chr IIIR 遺伝子の転写発現を評価した結果 (図 6B)、*AAD3*、*RDS1*、*ADH7*、*YCR102W-A*、および *YCR101C* の発現量は約 20~60%まで低下し、*YCR100C*、*YCR099C*、および *GIT1* の発現量は約 70%ま

で低下した。この発現パターンは、*spt8Δ* 株と同様であった (図 3B)。以上の結果から、Spt3 は Chr IIIIR における SAGA-TBP の境界形成に機能しており、Spt8 は SAGA の構造を維持することで Spt3 と TBP の相互作用を補助していることが予想された。

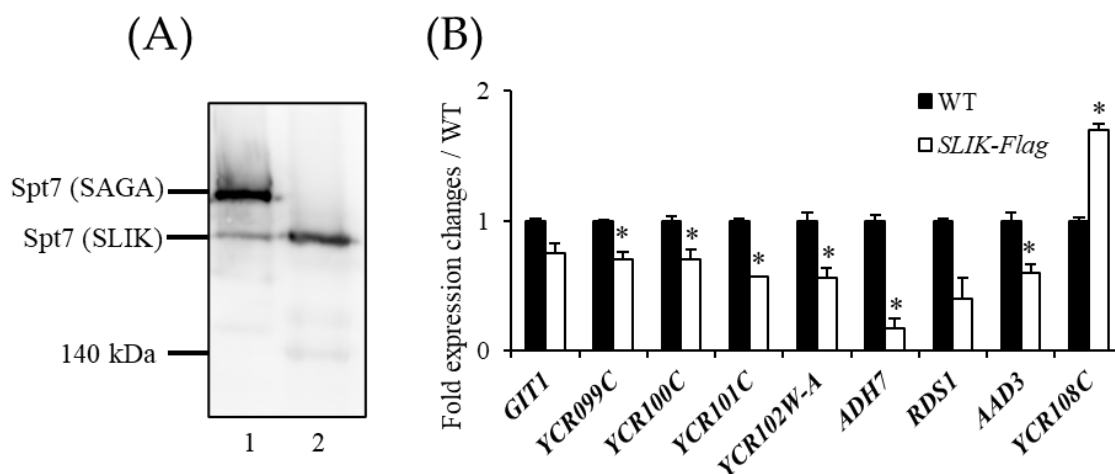


Figure 6. The SLIK complex is not sufficient for boundary formation. (A) Western blot analysis of protein extracts from strains producing Flag-Spt7 (lane 1) or SLIK-specific Spt7-Flag (lane 2). A 6% acrylamide gel was used for protein fractionation. Flag-tag was detected by an anti-Flag antibody. (B) Expression level of Chr III genes in the SLIK-Flag strain by RT-qPCR. Asterisks represent $p < 0.05$ compared with the WT (Student's T-test). Error bars show standard errors calculated from three independent experiments.

4.1.5 Spt3 と TBP の変異はサイレンシング領域の慎重を引き起こす

spt3, *spt8*, *spt15* 変異体では Chr IIIIR にサイレンシング領域の伸長が示唆された。転写抑制が Sir2/3/4 複合体によるサイレンシング領域の拡散に起因するかどうかを調べるため、*spt3Δ*, *spt8Δ*, *spt15(G174E)* 株で Chr IIIIR における Sir3 を標的としたクロマチン免疫沈降 (ChIP) 解析を行った (図 7A)。Tel 0.5 と Tel 7.5 をそれぞれポジティブコントロールとネガティブコントロールとした。いずれの株においても、本質的にサイレンシングされた遺伝子である *YCR108C* では Sir3 レベルに有意な変化は見られなかった。Sir3 レベルは *RDS1* および *ADH7* プロモーター領域で有意に増加した (図 7B)。この結果は、Spt3 と Spt8 が Chr IIIIR サイレncing境界の形成に関与していることを強く示唆した。

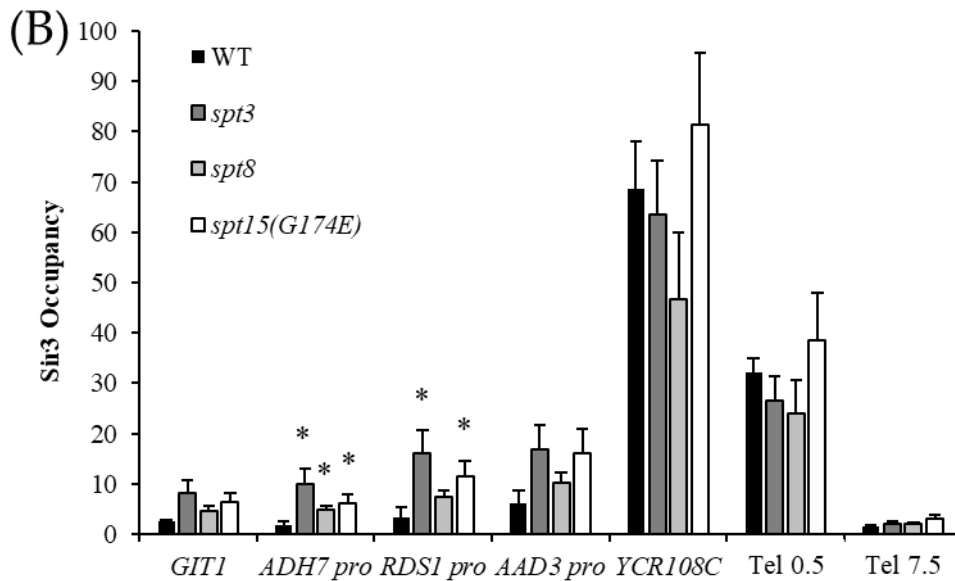
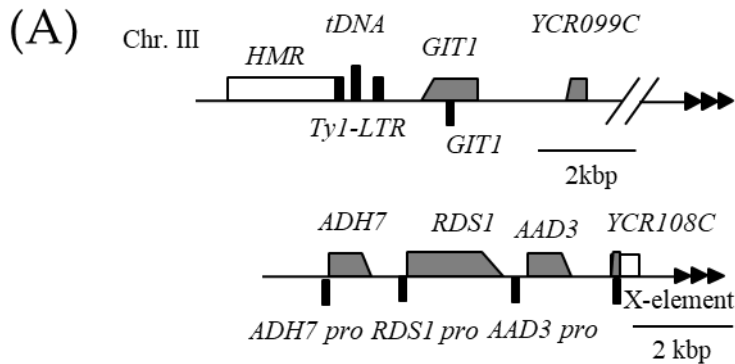


Figure 7. Silencing region was spread in *spt3Δ*, *spt8Δ*, and *spt15* mutants. (A) Primer position for the ChIP assay. Black bars mean primer positions. (B) Occupancy levels of Sir3 in WT, *spt3Δ*, *spt8Δ* and *spt15(G174E)* strain. Asterisks mean p < 0.15 compared with WT (Student's T-test). Error bars show standard errors calculated from three independent experiments.

4.1.6 考察

本研究では、サイレンシング境界制御における SAGA-TBP の影響を解明するため、SAGA の構成要素である Spt3 および Spt8 に注目し、境界制御に及ぼす影響を解析した。その結果、Chr IIIIR における境界形成は、TBP と SAGA 複合体の構成要素である Spt3 および/または Spt8 との相互作用によって制御されていることがわかった。しかし、SAGA-TBP によって形成される境界は *AAD3* と *YCR108C* の間に位置することが示唆されたが (図 3B)、この遺伝子間領域の塩基配列を *ampR* 塩基配列に置き換えても Chr IIIIR の遺伝子の転写には影響がなかったことから、Chr IIIIR における境界形成は *AAD3* と *YCR108C* の間の DNA 配列には依存していないことが示唆された (図 4B)。しかし、転写に重要な TBP との相互作用に関与する *spt3Δ*、*spt8Δ*

だけでなく、Spt3 との相互作用が弱くなった *spt15(G174E)* 変異株、Spt8 を欠損した SLIK-Flag 株でも、Chr IIIR 全体の遺伝子発現量が低下した (図 3B、図 5B、図 6B)。これは、TATA ボックスにリクルートされる TBP の量が減少し、その結果、転写が減少し、TBP が境界として機能しなくなったためと考えられる。実際、これらの変異体の *sir3Δ* で転写は回復した。我々は、SAGA が *ADH7* で作用し、隣接する 2 つのテロメア近位遺伝子 *RDS1* と *AAD3* にとって転写しやすい環境を作り出していることを提唱する。この転写活性化が *AAD3* に境界を作り、サイレンシング領域がテロメアから広がるのを阻止している。実際、この領域の遺伝子の中で、*ADH7* は TFIID よりも SAGA が優勢な TATA 配列を持つことが報告されており、我々の実験でも *ADH7* の転写は各変異株 (*spt3Δ*、*spt8Δ*、*spt15(G174E)*) で減少した (図 3B、図 5B)。さらに、*RDS1* と *AAD3* の転写レベルは *ADH7* よりも高く、これらの遺伝子の転写が境界として相乗的に機能していることが示唆された。しかし、今回の結果は、SAGA 複合体がこのサブテロメア領域に直接影響していることを証明するものではない。したがって、Chr IIIR の真の境界を形成する因子は SAGA-TBP の支配下にある可能性がある。SAGA 複合体はストレス応答遺伝子の発現を制御しており、特定のストレスに応答して誘導される遺伝子が Chr IIIR の境界形成の制御に関与していると考えられるからである。また、SAGA 複合体と TBP の変異株による Chr IIIR での遺伝子発現の抑制は、*SIR* 遺伝子の間接的な活性化によってサイレンシング領域が広がった結果である可能性も否定できない。

本研究において、SAGA-TBP による転写の活性化が ChrIIIR 領域の境界を制御し、遺伝子発現を調節していることが示唆された。特に Spt3 の TBP との相互作用がこの染色体領域では重要であり、同じく TBP と相互作用する Spt8 はあくまでも SAGA の構造維持に寄与することで、この領域の制御に関わっていた。この Spt3 優位な結果がこの染色体末端特異的なものか、あるいは他の染色体でも同様に Spt3 が重要になるのかを明らかにするためには、その他の染色体における SAGA の影響を解析する必要がある。

4.2 第2章 *IMD2* 領域におけるヒストン修飾因子の機能解析

4.2.1 8番染色体右腕においては *Spt8* が境界制御に寄与する

我々は *Spt3* 及び *Spt8* が境界形成に与える染色体特異性を解明するため、マイクロアレイ結果より *Spt3/Spt8* が影響する染色体の中から、これまでに *Sir* 複合体によるサイレンシング及び、*SAGA* 複合体の影響を受けることが報告されている 8番染色体右腕の *IMD2* 遺伝子に注目した[5, 8]。はじめに *IMD2* 領域での *SAGA* 複合体の影響を解明するため、ヒストンアセチル化活性を持つ *Gcn5*、ヒストン H2B 脱ユビキチン化活性を持つ *Ubp8*、*TBP* と相互作用する *Spt3* 及び *Spt8*、*SAGA* 複合体のコア構成因子中でも *IMD2* の MPA 感受性に関わる *Spt20* に注目した。各遺伝子の欠損株を作製し、RT-qPCR により影響を確認した (Fig 8A)。その結果、*gcn5Δ*、*ubp8Δ*、*spt20Δ* では WT に比べて転写量が有意に低下したため、これらの因子は *IMD2* 領域の境界形成に機能していることが示唆された。一方、*spt3Δ*、*spt8Δ* においては WT と比較しても発現量に有意差は見られなかった。そこで、*IMD2* は MPA 添加により発現誘導されることが報告されているため、上記破壊株で MPA 添加後の発現量の変化を RT-qPCR により解析した (Fig 8B)。その結果、*gcn5Δ* において MPA 添加時の発現誘導が有意に減少した。また、興味深いことに MPA 非添加時には影響が見られなかった *spt8Δ* では転写量が半分以下に低下した。しかし、MPA 感受性が増加すると報告されていた *Spt3* 及び *Spt20* に関しては MPA 添加時の影響が見られなかった。

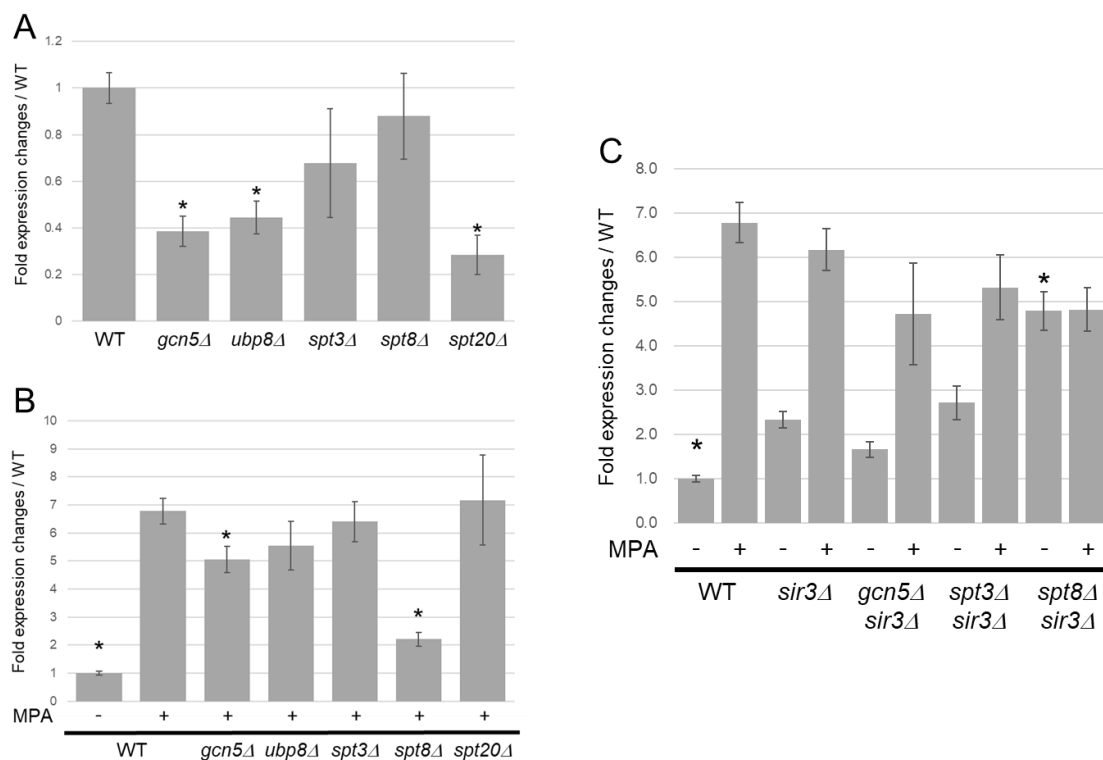


Fig. 8 The SAGA complex is involved in boundary formation that regulates *IMD2* expression (A) *IMD2* transcription levels were measured by RT-qPCR. All data were normalized with WT. Asterisks indicate $p < 0.05$ compared to WT (Student's T-test). (B) In MPA adding, *IMD2* transcription levels were measured. All data were normalized with WT MPA(-). Asterisks indicate $p < 0.05$ compared to WT MPA(+). (C) *IMD2* transcript levels were measured in the absence (-) and presence (+) of MPA. Data were normalized with WT MPA(-). Asterisks indicate $p < 0.05$ comparing *sir3Δ* MPA(-) to each MPA(-) sample (Student's T-test). Three or more biological replicate experiments were performed on all samples to confirm. These data are presented as mean \pm SEM.

次に *IMD2* 領域において SAGA 複合体が境界形成にのみ機能するのか、または MPA 添加による *IMD2* の発現誘導に影響するのかを調べた。サイレンシング欠損株として *sir3Δ* 株を用い、MPA 添加時に転写量が減少した *gcn5Δ*、*spt8Δ*、影響の見られなかった *spt3Δ* に対して、追加で *SIR3* を破壊し RT-qPCR を行った (Fig 8C)。その結果、*sir3Δ* では MPA 未添加状態では発現量が増加したが、MPA 添加時には発現量の変動はなく、Sir 複合体の有無による影響は確認できなかった。また、*gcn5Δsir3Δ* では MPA 添加の有無に関わらず、転写量が *sir3Δ* よりも減少したが、有意な差は見られなかった。興味深いことに *spt8Δsir3Δ* 株では、MPA 未添加状態で *sir3Δ* 以上に転写量が増加したにも関わらず、MPA 添加時には発現量の上昇が見られなかった。これより、*IMD2* 領域では SAGA 複合体の *Gcn5* や *Ubp8* が境界形成に機能することが示唆された。また、*spt8Δ* の MPA 添加時の転写抑制と、*spt8Δsir3Δ* における通常時の転写活性化から、*Spt8* は Sir 非存在時の転写活性化だけでなく境界のバランス調節に関与している可能性が示唆された。

4.2.2 境界制御において SAGA の安定化には *Spt8* が必要である

次に、*Spt8* は TBP や *Dst1*(TFIIS) との相互作用による転写伸長や、SAGA 型 SLIK 型の使い分けに関わっているため、各機能の境界制御への影響を調べた。そこで TBP (*Spt15*) と *Spt8* の相互作用を減少させるアミノ酸残基置換株(*spt15(R171E)*) や、*Spt8* と相互作用する転写伸長因子 S-II の欠損株(*dst1Δ*)、また SAGA 複合体において *Spt8* と結合する *Spt7* の欠損株(*spt7Δ*)、*Spt8* との結合部位を欠損させ、SLIK 型しか形成できない *Spt7* の C 末端切除株 (SLIK) を用いて、RT-qPCR による転写量解析を行った(Fig 9A)。その結果、TBP 変異及び TFIIS 欠損では MPA 添加時に転写量が増加し、影響しないことが明らかとなった。一方、*spt7Δ* と SLIK 株では *spt8Δ* 同様に薬剤非添加時には影響しないが、MPA 添加時の転写量が減少した。これは MPA による誘導時には、*Spt8* を含んだ完全な SAGA 複合体が必要であることを示

している。

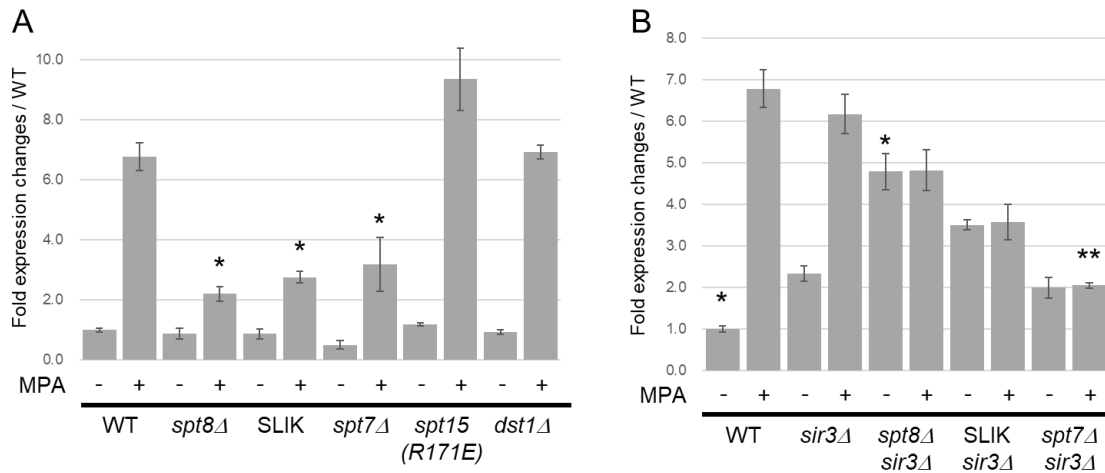


Fig. 9 Spt8, as part of the SAGA complex, regulates the induction of *IMD2* expression upon adding MPA (A) Transcript levels of *IMD2* without (-) and with (+) MPA were measured by RT-qPCR. Data were normalized with WT MPA (-). Asterisks indicate $p < 0.05$ comparing WT MPA(+) to each MPA(+) sample (Student's T-test). (B) *IMD2* transcript levels were measured in the absence (-) and presence (+) of MPA. Data were normalized by WT MPA(-). In MPA(-) samples, single asterisk (*) indicates $p < 0.05$ comparing *sir3Δ* MPA(-) to each MPA(-) sample (Student's T-test). In MPA(+) samples, double asterisks (**) indicate $p < 0.05$ comparing *sir3Δ* MPA(+) to each MPA(+) sample (Student's T-test). Three or more biological replicate experiments were performed on all samples to confirm. These data are presented as mean \pm SEM.

そこで Sir 非存在下における Spt8 の影響が SAGA 複合体の安定性に依存するかを確認するため、*spt8Δ*、*spt7Δ*、SLIK 株に対して追加で *SIR3* を破壊し、発現量を測定した(Fig 9B)。その結果、MPA による誘導において、*spt8Δsir3Δ* 同様に *spt7Δsir3Δ* と SLIK *sir3Δ* では発現量の増加は見られなかった。しかし、薬剤非添加時に *spt8Δsir3Δ* で見られた転写量の増加は SLIK *sir3Δ* では減少し、*spt7Δsir3Δ* では更に減少し *sir3Δ* と同程度の転写量まで低下した。この結果は SAGA 複合体において Spt7 が HAT のサブユニットとも相互作用することから、Spt7 の欠損により HAT のバランスが崩壊し転写活性化できなくなったと考えられる。しかし、*spt7Δ* の単独破壊では、MPA 添加時には *spt8Δ* よりも高い転写量を示した(Fig 9A)ことから、*IMD2* 領域では SAGA 複合体の代わりに機能する他の因子が転写に影響している可能性が考えられる。

4.2.3 8 番染色体右腕の境界制御には複数の HAT 関連因子が複合的に機能する

そこで、8 番染色体右腕の境界制御が複数のヒストン修飾因子が複合的に機能していると考え、Sir 複合体や SAGA 複合体以外のヒストン修飾因子の影響を調べた。そこで、SAGA 複合体以外の HAT 複合体である SAS-I、NuA3 から HAT 活性を持つ Sas2 及び、Sas3、また NuA4 の HAT 活性を持つ Esa1 は必須遺伝子なので、破壊可能な Eaf3 を選択した。その他の因子として、HAT 活性を持つ Rtt109、ヒストン脱アセチル化活性を持つ Rpd3 と hda1、境界制御因子のスクリーニングでも取られたヒストンメチル化酵素の Dot1 に関して、MPA 添加の影響を解析した (Fig 10A)。その結果、*eaf3Δ*、*rtt109Δ*、*rpd3Δ*、*hda1Δ*、*dot1Δ*では MPA 非添加時の発現量が優位に低下したことから、通常時に境界制御のバランスに関わる可能性がある。中でも、*eaf3Δ* と *rtt109Δ*に関しては MPA の添加による転写活性化が低下した。これより複数のヒストン修飾関連因子の中でも、Eaf3 及び Rtt109 が 8 番染色体右腕の境界制御に関わっていることが考えられた。そこで、Eaf3 及び Rtt109 が SAGA の Spt8 と同様に機能するのか、それともこれらの因子には状況に応じた使い分けがあるかを確認するため、通常時とサイレンシング解除時、MPA 添加時の各状況における転写量の変化を解析した。サイレンシングの解除は Sir2 のヒストン脱アセチル化活性阻害剤ニコチンアミド (NAM) を用い[1, 90, 91]、サイレンシング解除時のコントロールとして *sir3Δ*、*IMD2* 発現時のコントロールとして *IMD2* の抑制に必要な Sub1 の欠損株を使用した (Fig 10B)。その結果、*spt8Δ*、*eaf3Δ*、*rtt109Δ*において、MPA 添加時は一様に転写活性化が抑制されたが、NAM 添加時では、*spt8Δ*は *sir3Δ*以上の転写上昇を示したが、*eaf3Δ*では *sir3Δ*と同程度、*rtt109Δ*は *sir3Δ*以下の転写量であった。この結果は、Spt8 は MPA による誘導時に機能し、Eaf3 は境界の維持に作用するが MPA による発現誘導時には Spt8 ほど重要ではないことを示している。また、Rtt109 は境界の維持だけでなく、MPA 添加時にも機能しており、*IMD2* 領域において最も重要な因子であると考えられる。

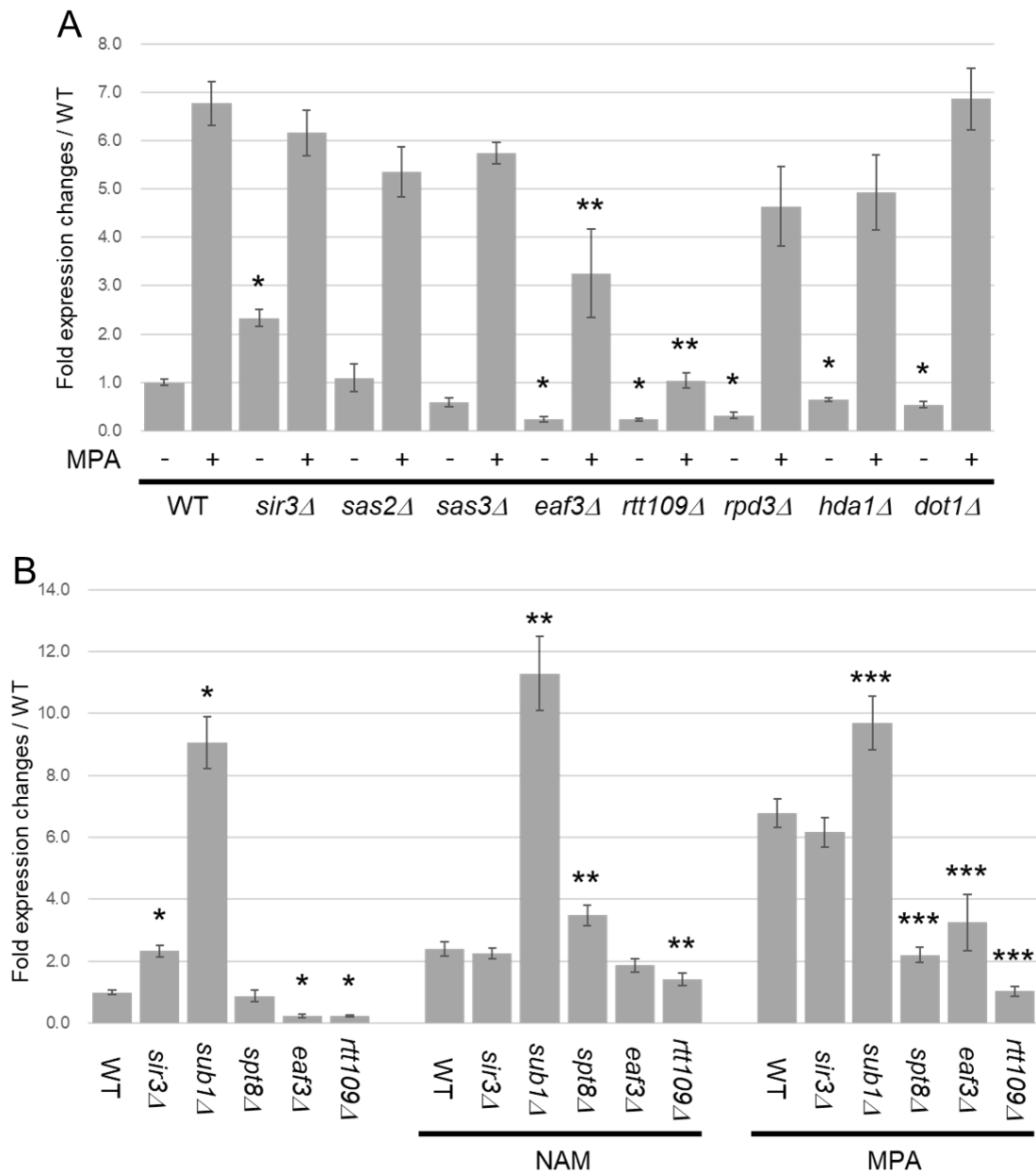


Fig. 10 *IMD2* expression is regulated by multiple HAT related factors regulating its boundaries (A) Transcript levels of *IMD2* without (-) and with (+) MPA were measured by RT-qPCR. Data were normalized by WT MPA(-). In MPA(-) samples, single asterisk (*) indicates $p < 0.05$ comparing WT MPA(-) to each MPA(-) sample (Student's T-test). In MPA(+) samples, double asterisks (**) indicate $p < 0.05$ comparing WT MPA(+) to each MPA(+) sample (Student's T-test). (B) *IMD2* transcript levels were measured without the drug, with NAM, and with MPA. Data were normalized by WT without drug. In drug free samples, single asterisk (*) indicates $p < 0.05$ comparing WT to drug free samples (Student's T-test). In NAM

samples, double asterisks (**) indicate $p < 0.05$ comparing WT NAM to each NAM sample (Student's T-test). In MPA samples, triple asterisks (***) indicate $p < 0.05$ for WT MPA comparing WT MPA to each MPA sample (Student's T-test). Three or more biological replicate experiments were performed on all samples to confirm. These data are presented as mean \pm SEM.

4.2.4 8 番染色体右腕では HAT 関連因子の使い分けで発現状態が制御される

次に、サイレンシング領域制御の影響は一細胞ごとに異なることが報告されているため、細胞集団で行う転写量解析では、各破壊株が及ぼす個々の細胞における発現状態の差を見落としている可能性がある。そこで我々は *IMD2* の ORF を *HTB1-EYFP* に置換した蛍光株を用い、通常時とサイレンシング解除時、MPA 添加時の各状況における EYFP を発現している細胞の割合及び発現強度から *spt8Δ*、*eaf3Δ*、*rtt109Δ* の影響を確認した (Fig 11, Table 4)。 *IMD2* の抑制因子である *SUB1* の破壊株では、薬剤の有無に関係なく常に全細胞で高い発現を示しており、細胞間で影響に差が見られなかった。また、WT では ON 細胞が 60% 存在したが、その半分以上が ON low (33.1%) または ON middle (21.4%) であり、ON high は 5.5% しか存在しなかった。NAM 添加により ON low (42.1%)、middle (35.3%)、high (8.3%) 全てで割合が増加しており、この結果はサイレンシングが解除され細胞全体において発現が誘導されたことを示している。MPA 誘導時は、NAM 同様細胞の大半が ON (94.8%) を示したが、その多くは ON high (91.0%) であった。一方、全ての細胞が ON となっている *sir3Δ* では NAM の影響がなかったが、MPA 添加によって全ての細胞が ON high となった。これより、NAM では細胞全体を ON にするが個々の細胞の発現量は Sir 複合体非依存的に決まることが考えられた。また、*sir3Δ* では WT よりも MPA が効いていることから、ON 細胞は発現の強さに関わらず MPA 添加後に発現が誘導されやすい傾向がある。各破壊株では WT よりも低い ON の割合を示したが、中でも *eaf3Δ* は ON 細胞 (32.6%) 中にはほぼ ON high (0.7%) が含まれていなかったが、ON low (6.6%)、ON middle (25.2%) が他の破壊株に比べて多く存在していることから、Eaf3 が含まれる NuA4 複合体は MPA 非添加時に発現を誘導する活性化因子として機能している可能性がある。事実、NAM 添加時も ON high (1.8%) がほぼ誘導されなかった。また、MPA 添加時には ON の割合が 78.8% と高いことから、MPA による誘導に NuA4 は機能しない可能性がある。一方、*spt8Δ* では転写レベルの変化は捉えられなかったが (Fig 10B)、細胞ごとの発現状態には影響が出た。特に ON high (7.0%) は WT 変わらなかったが、全体の ON 細胞 (20.2%) が減少したことから、SAGA 複合体は通常時は細胞全体でサイレンシングを解除し、弱く発現を誘導することで、MPA 添加時に発現誘導しやすい状況を整えている可能性がある。そのため MPA 添加時の ON 細胞 (49.6%) の大半は ON high (31.1%) となっていたが約半分の細胞では誘導されなかった。また、NAM 添

加時には WT と同程度の発現誘導が見られただけでなく、WT 以上に ON high (23.2%)が存在したことから、サイレンシング解除時には異なる HAT 複合体同士のバランスが崩れ NuA4 が有意となった可能性がある。*rtt109Δ*では *spt8Δ*や *eaf3Δ*と異なり特徴的な影響は見られず、薬剤非添加時には ON low (12.2%)、ON middle (5.7%)、ON high(3.3%)の全てが減少していた。NAM 添加時には *spt8Δ*と *eaf3Δ*の中間のような表現型を示し、MPA 添加時には *spt8Δ*と似た発現状態であった。これより Rtt109 は境界制御だけでなく、MPA 添加時の転写活性化にも必要であるが、NAM 添加時の ON high (9.1%)が WT と変わらなかったことから、NuA4 や SAGA とのバランスには影響を及ぼさないのかもしれない。以上のように 8 番染色体右腕では、SAGA や NuA4 といった HAT 関連因子間のバランスが境界の制御に寄与している可能性がある。これらの関係性がインダイレクトである可能性は否定できないが、この領域において複数の HAT 関連因子が影響することは確かであり、今後はヒストン修飾のクロストークの影響も含めて研究を進めていく。また、SAGA 複合体の中でも Spt8 は TBP や TFIIS との相互作用とは関係なく、構造の安定化に関わり、SAGA 複合体の機能維持に必要であった。

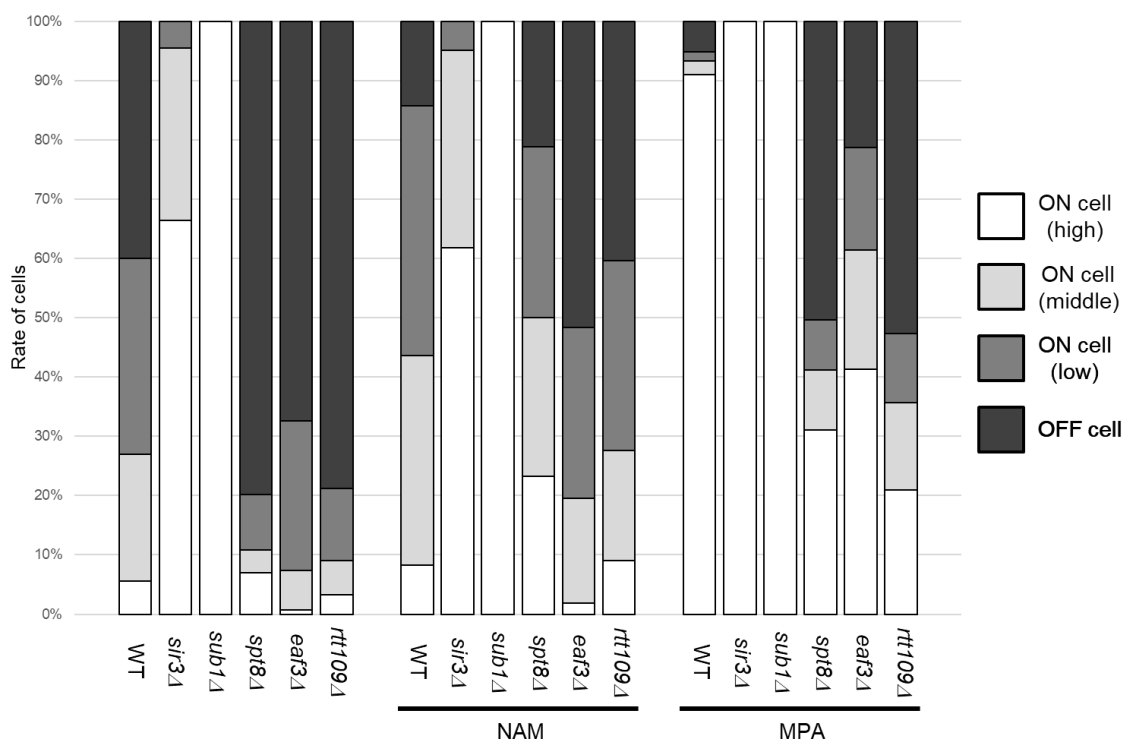


Fig. 11 *IMD2* expression is regulated by the use of multiple HAT related factors. The expression status of fluorescent strains in the absence of drug, with NAM, and with MPA was classified as ON (high) (white), ON (middle) (gray), ON (low) (dark gray), and OFF (black), with each percentage shown as a stacked vertical bar graph. The horizontal axis represents the

sample, and the vertical axis represents the rate of cells. These data are based on the fluorescence microscopy results of at least 100 cells (n>100) in each sample, with the number of cells observed as 100% and the rate of cells in each expression state.

Table 4 Percentage of expression states for each condition

		ON high	ON middle	ON low	ON total	OFF
WT	YPD	5.5%	21.4%	33.1%	60.0%	40.0%
	NAM	8.3%	35.3%	42.1%	85.7%	14.3%
	MPA	91.0%	2.2%	1.5%	94.8%	5.2%
<i>sir3Δ</i>	YPD	66.4%	29.1%	4.5%	100.0%	0.0%
	NAM	61.8%	33.3%	4.9%	100.0%	0.0%
	MPA	100.0%	0.0%	0.0%	100.0%	0.0%
<i>spt8Δ</i>	YPD	7.0%	3.9%	9.3%	20.2%	79.8%
	NAM	23.2%	26.8%	28.9%	78.9%	21.1%
	MPA	31.1%	10.1%	8.4%	49.6%	50.4%
<i>eaf3Δ</i>	YPD	0.7%	6.6%	25.2%	32.6%	67.4%
	NAM	1.8%	17.7%	28.9%	48.4%	51.6%
	MPA	41.3%	20.1%	17.3%	78.8%	21.2%
<i>rtt109Δ</i>	YPD	3.3%	5.7%	12.2%	21.2%	78.8%
	NAM	9.1%	18.5%	32.1%	59.6%	40.4%
	MPA	20.9%	14.7%	11.6%	47.3%	52.7%
<i>sub1Δ</i>	YPD	100.0%	0.0%	0.0%	100.0%	0.0%
	NAM	100.0%	0.0%	0.0%	100.0%	0.0%
	MPA	100.0%	0.0%	0.0%	100.0%	0.0%

4.2.5 考察

本研究では、8番染色体右腕の *IMD2* 遺伝子領域における境界制御と MPA 添加に対する SAGA 複合体構成因子の影響及び、境界制御と MPA 添加時におけるヒストン修飾因子間の役割を解析した。その結果、SAGA 複合体の HAT 活性や DUB 活性が境界制御に関わることが示唆された (Fig 8A)。また、TBP と相互作用する Spt8 は境界制御には影響を及ぼさなかったが、MPA 添加後の発現誘導には必要であることが明らかとなった (Fig 8B)。しかし、既に報告されている MPA 感受性のスクリーニング結果とは異なり、MPA 添加による発現誘導に Spt8 同様 TBP と相互作用する Spt3 は影響しなかった。その理由の一つとして MPA の濃度が考えられる。高濃度の MPA 添加時には Spt3 が TBP との相互作用により転写を活性化させるのかもしれない。次に、MPA 添加時の誘導には、Spt8 の機能である TBP や TFIIS との相互作用は重要では

なかったが (Fig 9A)、SAGA 複合体において Spt8 と相互作用している Spt7 の C 末端を切断、または Spt7 を欠損させると、*spt8Δ*と同様に MPA 添加時の発現量が低下したことから、MPA 添加時の発現誘導には、Spt8 を含んだ SAGA 複合体が必要であると考えられる。この結果は ChrIIIIR 領域で Spt3 が優位に機能するのは反対に、*IMD2*領域では Spt8 が優位に機能していることを示しているが、Spt8 の持つ他のタンパク質との相互作用能力は重要ではなく、ChrIIIIR 領域と同様に SAGA 複合体の安定性の維持に Spt8 が機能していることを示していた。また、Sir3 非存在下において *spt8Δsir3Δ*で見られた *sir3Δ*よりも高い発現量が、*spt7Δsir3Δ*では抑制され *sir3Δ*と同程度になっていたことから (Fig 9B)、SAGA 複合体の構造安定性の低下が転写活性化能に影響している可能性がある。事実、*gcn5Δsir3Δ*で MPA 添加時の発現量が減少したことや、Spt7 が SAGA 複合体において HAT のサブユニットと相互作用していることから、Spt7 を失った SAGA では HAT の機能が低下するのかもしれない。以上より、MPA による誘導時には Spt8 を含んだ SAGA 複合体を形成していることが重要であり、*IMD2*領域において SAGA 複合体は境界制御だけでなく、MPA による誘導にも関わっていることを示唆していた。

また、SAGA 複合体の機能が損なわれている *spt7Δ*において、MPA 添加時の発現量は WT よりも減少していたが、*spt8Δ*より高かったことから、SAGA 複合体以外のヒストン修飾因子が MPA 添加時に機能していると考え、影響を確認した。その結果、NuA4 の構成因子である Eaf3 や HAT 活性を持つ Rtt109 がこの領域の境界制御及び MPA 添加時の誘導に寄与していることが明らかとなった (Fig 10A)。しかし、*spt8Δ*、*eaf3Δ*、*rtt109Δ*それぞれで NAM や MPA 添加時の発現量に違いが見られ、全てが一緒に機能し転写活性化に寄与しているわけではないと考えられる (Fig 10B)。そこで HAT 関連因子間の関係を明らかにするため、蛍光顕微鏡で細胞ごとの発現状態を解析した結果、*spt8Δ*、*eaf3Δ*、*rtt109Δ*の全てで発現している細胞の割合は減少していたが ON 細胞の発現状態には違いが見られた (Fig 11)。これより、*IMD2*領域での境界制御は Rtt109、SAGA、NuA4 と Sir 複体のバランスによって制御されており、OFF 細胞では Sir 複体が優勢である、あるいは HAT が誘導されていないと考えられる。ON low/middle では Rtt109 や SAGA が優勢になっている一方、ON high では Rtt109 と NuA4 が優位となり発現状態を制御していると考えられる (Fig 12)。実際、*spt8Δsir3Δ*において MPA 非添加で発現量が増加していたことは (Fig 8C)、SAGA と NuA4 のバランスが崩れ、NuA4 優位な状況となっていることを表しているのかもしれない。しかし、この境界においてこれらヒストン修飾因子のバランスを何が調節しているかを明らかにすることは今後の課題である。また、Rtt109 の影響は ON low/middle と ON high 両方に作用しており、SAGA や NuA4 のバランスを制御するわけではないが、SAGA や NuA4 が誘導されやすくする基盤のような役割を果たしているのかもしれない。実際、Rtt109 は SAGA と NuA4 の両方と遺伝的相互作用

を持っていることが報告されている。以上より、我々は完全な SAGA 複合体が 8 番染色体右腕の境界制御だけでなく、MPA 添加時に必要であることを明らかにした。また、この領域では複数の HAT 関連因子 (SAGA、NuA4、Rtt109) が境界制御に関与するだけでなく、それぞれが異なる役割を果たしていることが顕微鏡解析により示唆された。しかし、個々の細胞における HAT の使い分けが何によって調節されているかは明らかに出来なかった。その調節因子の候補として、*IMD2* が GTP の生合成系に関わること、また GTP 依存的な調節を受けることから、GTP が間接的に影響しているかもしれない。さらに、今回解析した SAGA や NuA4、Rtt109 の影響が間接的なものである可能性は否定できないため、今後は細胞の発現状態を基にした分取と解析により、*IMD2* 領域における働きを解明する。

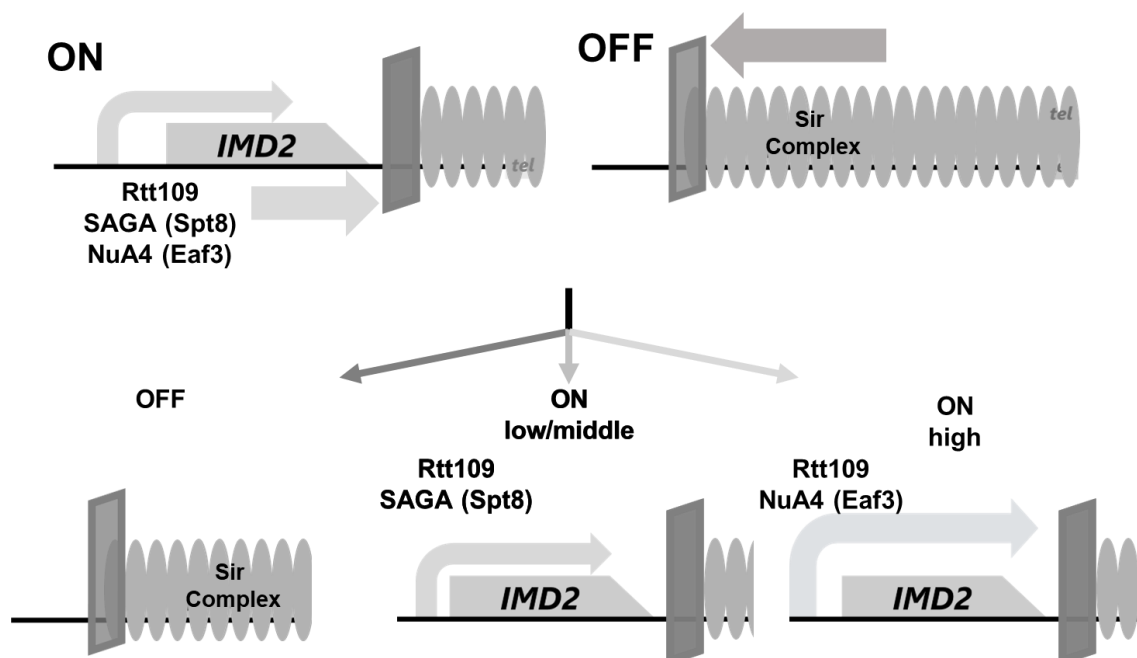


Fig. 12 Boundary control mechanism model of *IMD2* region In the *IMD2* region, the balance between HAT related factors (Rtt109, SAGA (Spt8), NuA4 (Eaf3)) and the Sir complex determines the expression state. In OFF cells, the Sir complex predominates, and *IMD2* is silenced. In all ON cells, Rtt109 is functional. In ON low/middle cells, SAGA (Spt8) is dominant and weakly induces *IMD2*. In ON high cells, NuA4 (Eaf3) is dominant and strongly induces *IMD2*.

本研究では、SAGA の影響を受ける領域として *IMD2* に注目し、ChrIIIR 領域とは異なり Spt8 が優位に働いていることを明らかにした。また、この領域の制御には SAGA だけでなく NuA4 や Rtt109 等の複数の HAT 関連因子が使い分けられることで、*IMD2* の発現状態を細かく調整していることが明らかとなった。このように

*IMD2*領域では、個々の発現状態を制御するために様々な因子が機能している。そこで、*IMD2*の発現制御機構をより詳しく解析することで、ヘテロクロマチン領域（サイレンシング領域）が変動するメカニズムを解明できると考えた。

4.3 第3章 GTP 依存的なヘテロクロマチン領域制御の1細胞解析

4.3.1 *IMD2*のサイレンシングはGTP 依存的に解除される

IMD2 領域では様々な HAT 関連因子が機能し、サイレンシング状態を制御していることが見出したが、どのような時にサイレンシングが解除され（ヘテロクロマチンが変動し）、*IMD2*が誘導されるのかはわからなかった。そこで、*IMD2*のネイティブな発現制御機構に関して解析を行った。まず、Sir 複合体それぞれの因子が *IMD2*の発現を抑制しているかどうかを確認するため、野生型 (WT) と *SIR2*、*SIR3*、*SIR4* 欠失株を用いて、RT-qPCR により *IMD2*の発現量を測定した (Fig 13)。その結果、各 *SIR*破壊株では WT 株と比較して *IMD2*の発現が上昇しており、*IMD2*の発現が Sir 複合体によって制御されていることを確認した。

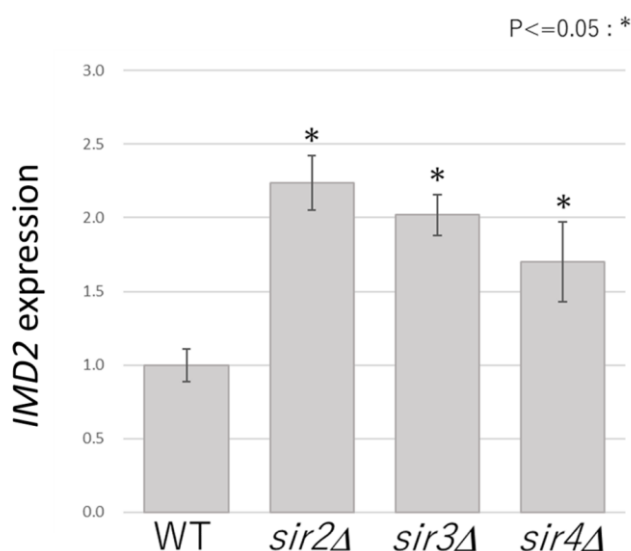


Fig 13. *IMD2* is repressed by the Sir complex. *IMD2* expression was analyzed by RT-qPCR. Three or more replicate experiments were performed on all samples. Data were normalized to the WT. These data are presented as mean ± SEM. Asterisks indicate $p < 0.05$ compared with the WT (Student's T-test).

*IMD2*の発現はGTPの減少に応答して誘導されることから、*IMD2*領域におけるヘテロクロマチンの変動もGTP量に依存すると考え、WT株と*sir3Δ*株におけるMPA濃度の関数としての発現量の変化を解析した (Fig 14)。0.060μg/mLのMPAでは、WTの*IMD2*発現量は*sir3Δ*と同レベルまで増加し、*IMD2*のサイレンシングは0.060μg/mLのMPAで逆転することが示された。これらの結果は、DNA配列依存的な転写制御よりも早い段階で、GTPの枯渇や減少を感知し、*IMD2*領域のヘテロクロマチンに作用する制御機構の存在を示唆した。

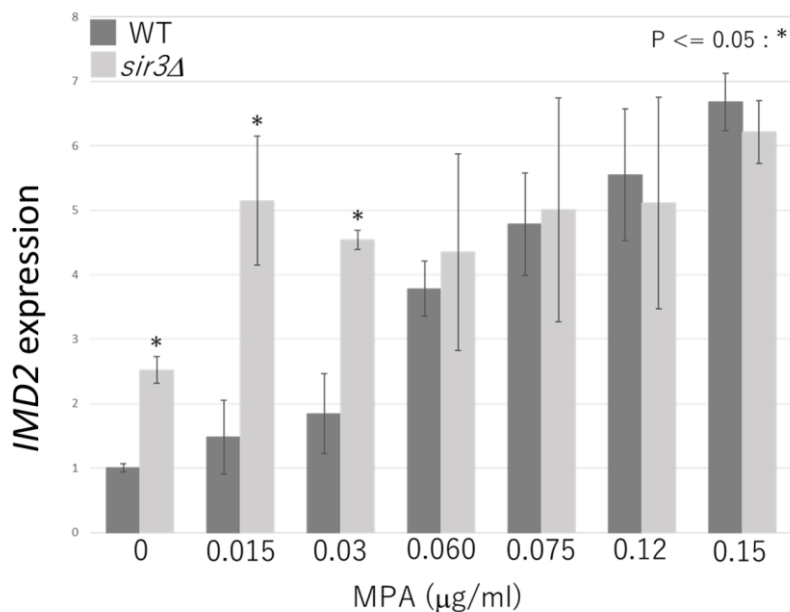


Fig 14. *IMD2* silencing is reversed in a GTP-dependent manner. *IMD2* expression levels upon treatment with mycophenolic acid (MPA) were analyzed by RT-qPCR. Three or more replicate experiments were performed on all samples. Data were normalized to WT (MPA 0 μg/mL). These data are presented as mean ±SEM. Asterisks indicate $p < 0.05$ compared with the WT at each MPA concentration (Student's T-test).

4.3.2 ヘテロクロマチンの安定性は細胞ごとに異なる

個々の細胞における *IMD2* の発現状態変化を追跡するために、われわれは以前開発した蛍光顕微鏡下での単一細胞追跡システムを用いた[85]。蛍光顕微鏡下で *IMD2* の発現状態を観察するため、*IMD2* の ORF 領域を *HTB1-EYFP* に置き換えた株を作製した。(図 15A)。*IMD2* の欠失が増殖に影響を及ぼすかどうかを調べるため、FUY1735 に MPA を添加したところ、増殖異常は観察されなかった (図 15B)。そこで、異なる濃度の MPA (0 μg/mL、0.015 μg/mL、0.075 μg/mL、0.150 μg/mL) が、個々の細胞でどの程度発現を誘導するかを試験した。追跡は単一細胞で開始し、5 時間後に MPA を添加して 15 時間まで追跡した (図 15C)。

RT-qPCR の結果と同様に、EYFP の発現量が MPA 濃度に依存して上昇することが観察されたことから、*IMD2* の発現状態を 1 細胞レベルで示していることが確認できた。そこで、各 MPA 濃度についてランダムに 10 細胞を選択し、0~12 時間までの発現状態変化を 1 時間間隔で定量した (図 15D)。その結果、*IMD2* の発現誘導は MPA 濃度に依存するが、誘導後の発現レベルは細胞ごとに異なることがわかった。この結

果は、*IMD2*領域のヘテロクロマチンの安定性が細胞によって異なることを示唆している。興味深いことに、一部の細胞はMPA投与前でも*IMD2*を弱く発現していた。このことは、GTP枯渇前のヘテロクロマチンの揺らぎが細胞によって異なり、GTPが*IMD2*の発現レベルを調節していることを示している。

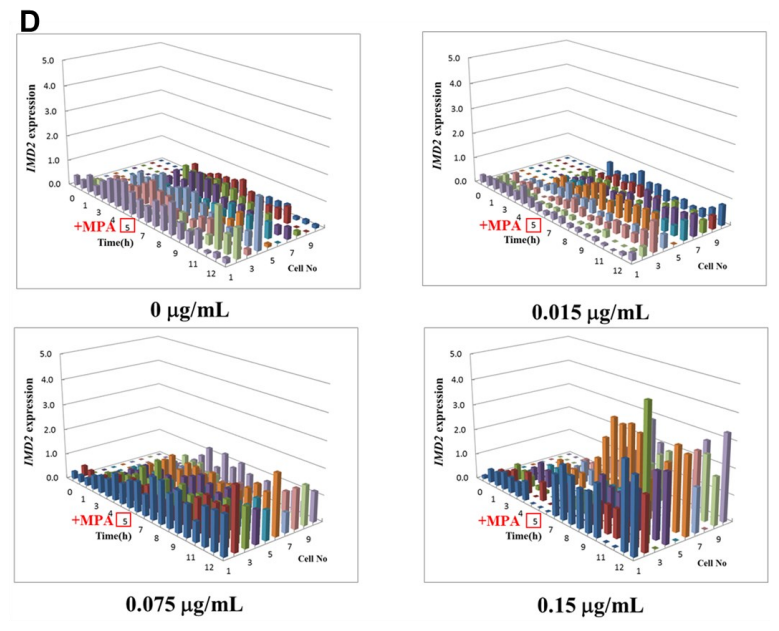
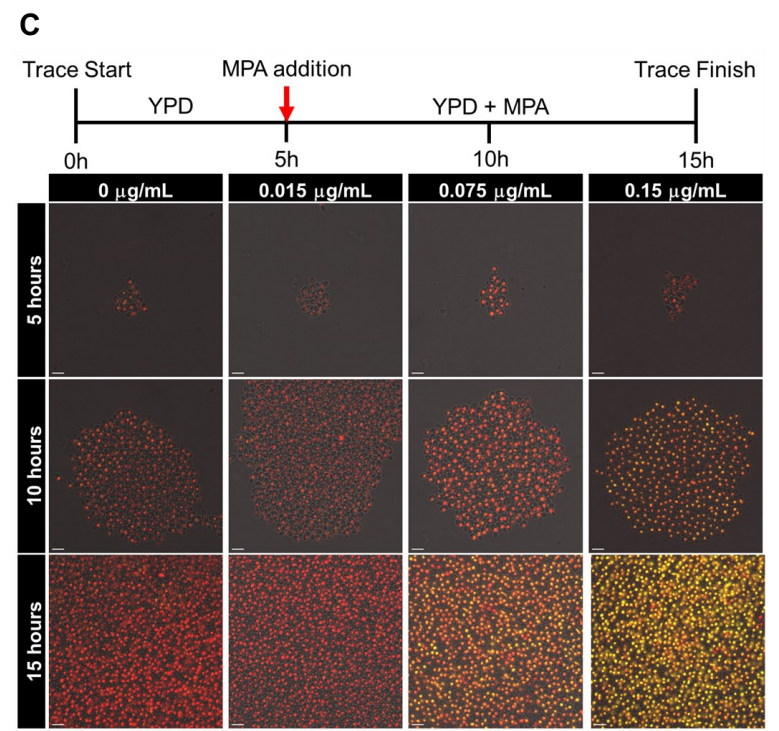
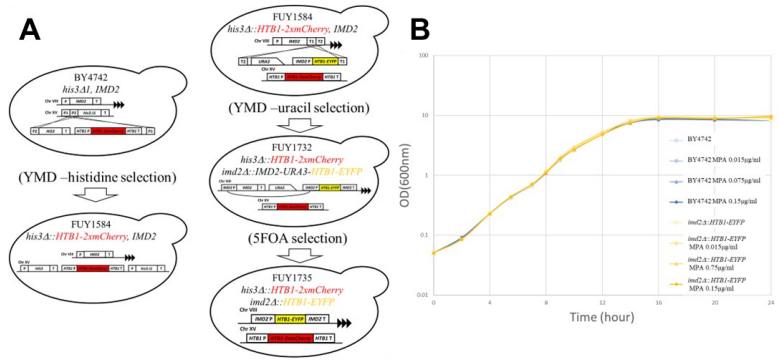


Fig 15. GTP-dependent induction of *IMD2* expression differs between individual cells. *IMD2* expression was followed at the single-cell level after the addition of MPA. (A) Schematic representation of the FUY1735 fluorescent strain generation used in the single-cell experiment. (B) Growth curves of WT (BY4742) and FUY1735 strains with MPA. (C) Single-cell tracking of the FUY1735 strain with MPA and fluorescent images acquired at each time point (5 h, 10 h, and 15 h). Red, mCherry (control); yellow, EYFP (*IMD2*). Scale bars: 10 μ m. (D) Ten cells were selected randomly from the tracking results in (C) and the expression status of *IMD2* (EYFP) in each cell was measured.

4.3.3 *IMD2*は細胞集団で不均一に発現している

MPAによるGTPの減少がない時の*IMD2*の発現状態を確認するため、YPDで10時間、15分間隔で1細胞追跡を行った。その結果、MPA非存在下にもかかわらず、EYFPの蛍光強度が変動しており、*IMD2*の発現状態が何度も切り替わることがわかった (Fig 16A)。そこで、最初に*IMD2*を発現した母細胞に注目し、その発現状態の変化を追跡した。その結果、*IMD2*の発現は最初の3時間で徐々に減少し、3時間から6時間まではOFFとなり、その後は再度増加しONとなることがわかった (Fig 16B)。この発現状態の規則性がすべての娘細胞で観察されるかどうかを調べるため、最初の発現状態がONであった母細胞と、そこから派生した29個の娘細胞の発現変化を定量した (Fig 16C left panel)。その結果、娘細胞の*IMD2*の発現状態は細胞によって異なり、常に*IMD2*を発現しているON細胞が20%、*IMD2*がOFFを維持している細胞が27%、ONとOFFを切り替えている細胞が53%であった (Fig 16D left panel)。次に、母細胞の影響を確認するため、初期段階で*IMD2*を発現していない母細胞を追跡し、娘細胞の発現状態の変化を調べた (Fig 16C, D right panel)。その結果、母細胞とそこから派生した29個の娘細胞の発現状態には、ONのままの細胞 (23%)、OFFのままの細胞 (13%)、ONとOFFを切り替える細胞 (63%) が含まれ、母細胞の発現状態が娘細胞の発現状態に影響を与えないことがわかった。

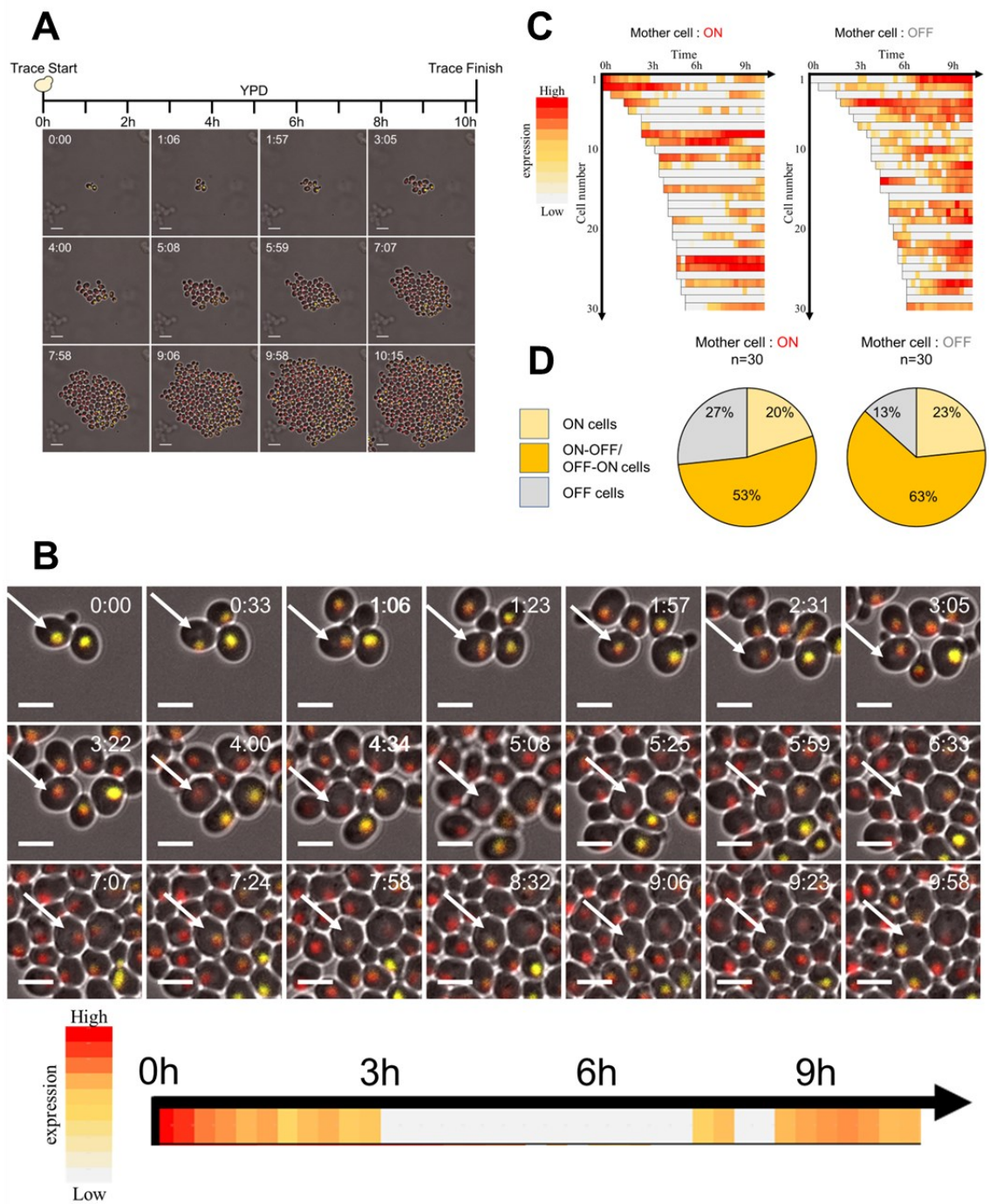


Fig 16. *IMD2* is expressed heterogeneously in cell populations. Single-cell tracking of the FUY1735 fluorescent strain without MPA. (A) Image tracking of a single cell in a population. Scale bars: 10 μ m. (B) Upper panel: image tracking of a single cell. Lower panel: expression state of a single cell. Horizontal axis indicates time. The expression state intensity is shown as follows: gray (OFF), yellow (ON, low), and

red (ON). The white arrow indicates the single cell being tracked. Scale bars: 5 μ m. (C) Expression state of individual cells in the cell population. Left panel: expression status tracking of a population derived from a single ON cell. Right panel: expression status tracking of a population derived from a single OFF cell. The horizontal axis indicates the time, and the vertical axis indicates the number of cells. The intensity of the expression state is shown as follows: gray (OFF), yellow (ON, low), and red (ON). (D) Cell expression state classified into three types: ON, OFF, and ON-to-OFF/OFF-to-ON. The percentage of cells in the cell population is shown in (C). Left panel: cell population tracked from an initial ON cell. Right panel: cell population tracked from an initial OFF cell.

次に、*IMD2*の発現状態変化が細胞周期に依存するのか、確率的に起こるのかを調べるため、*EYFP*が発現する時の細胞周期を決定した。最初の母細胞がONであった30細胞のうち、発現がOFFからONに切り替わった13細胞について、切り替わる前後の形状から細胞周期を定義した (Fig 17A)。*EYFP*は細胞周期のG1からS期初期までに誘導された。次に、増殖に伴って変化する、発現状態が変動する細胞集団におけるON/OFF細胞の比率に注目した。全体の細胞数が30個以上になってから2.5時間、15分間隔で細胞集団中のON細胞の割合を測定した (Fig 17B)。興味深いことに、細胞が増殖しても、細胞集団中のON細胞の割合はほぼ一定であった (30-40%)。これらの結果から、GTP枯渇時の*IMD2*発現制御は、個々の細胞における細胞周期依存性だけでなく、細胞集団におけるON細胞とOFF細胞の比率を一定に保ち、細胞集団全体のGTP減少に即座に対応するメカニズムが存在する可能性が示唆される。

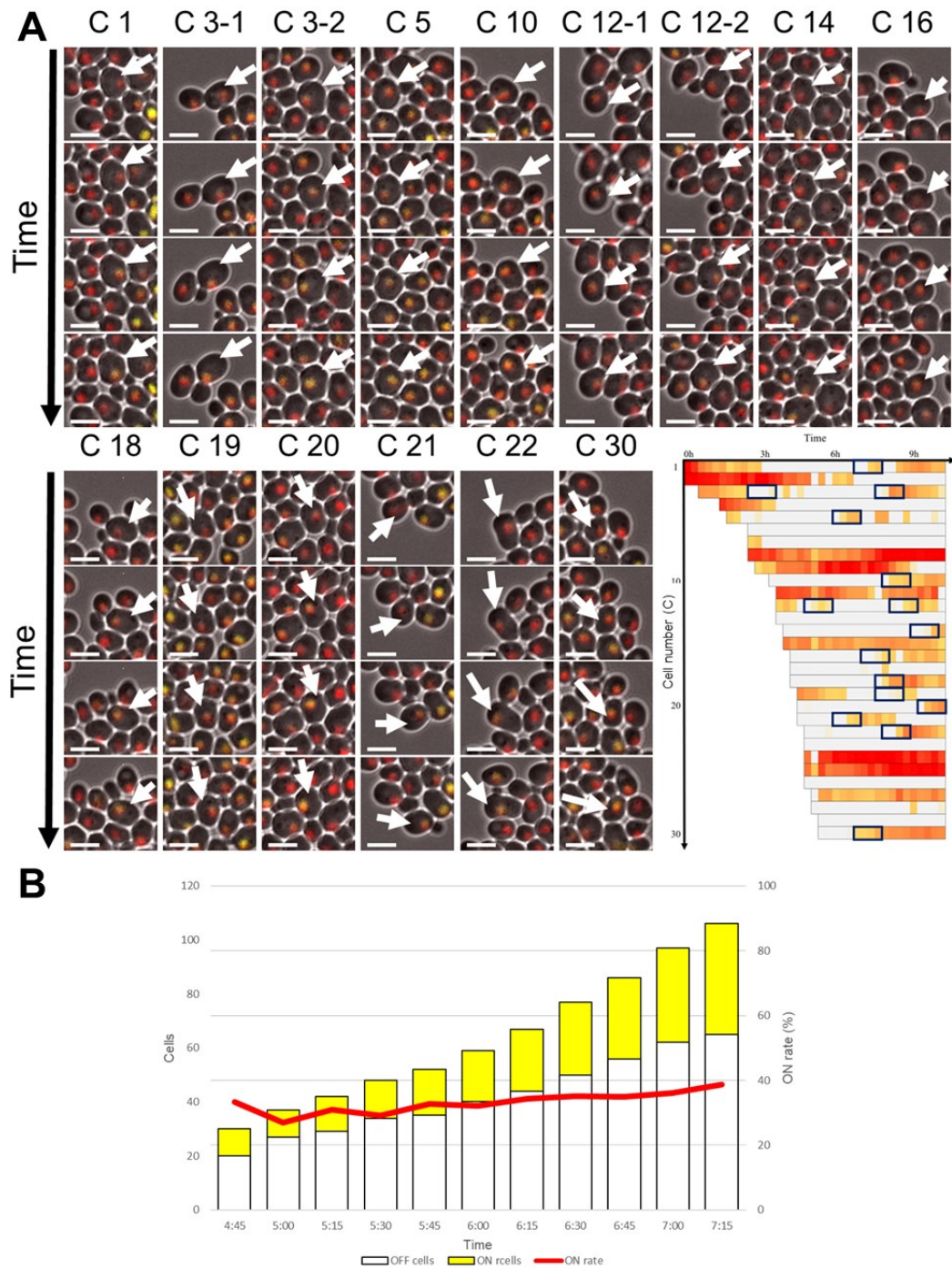


Fig 17. *IMD2* expression is regulated in a cell cycle-dependent manner. (A) Images of cells (Fig 4C, left panel) whose expression state was switched from OFF to ON during the tracking, before and after the switch. The images were extracted from the black, framed areas in the lower right panel. Arrows indicate cells that switched expression. The vertical axis represents the time. Scale bars: 5 μ m. (B)

Percentage of ON cells in the cell population in left panel of Fig. 4C. The left vertical axis represents the cell number. ON cells are shown as yellow and OFF cells as white overlaid bars. The right vertical axis indicates the percentage of ON cells relative to the total number of cells. The red line denotes the change in the ON cell rate. The horizontal axis represents the time elapsed after the total number of cells exceeded 30.

4.3.4 *IMD2*の不均一性はヒストン脱アセチル化酵素と GTP により制御される

*IMD2*領域の GTP 枯渇に伴う発現制御機構を解明するために、ヘテロクロマチン形成に必要な Sir 複合体の影響を調べた。*sir3Δ*株 (FUY1807) を作製し、YPD 培養下で 1 細胞追跡を行った (Fig 18A)。1 つの細胞から培養を開始し、すべての細胞を 15 分間隔で 10 時間追跡して、各細胞における EYFP の発現レベルを測定した (Fig 18B)。その結果、EYFP はすべての細胞で高発現しており、Sir 複合体が細胞の発現不均一性の制御に関与していることがわかった。そこで、Sir 複合体の構成要素である Sir2 のヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 活性が、*IMD2*領域における発現状態の多様性の制御に必須であるかどうかを調べた。Sir2 の HDAC 阻害剤であるニコチンアミド (NAM) を WT 株に添加し [1, 90, 91]、その効果を単細胞レベルで確認した (Fig 18C)。1 細胞追跡を 15 分間隔で行い、各細胞の EYFP 蛍光強度を測定した。その結果、YPD 中で最初の 8 時間は細胞ごとに EYFP の発現量が異なり、細胞間で多様な発現状態が見られた (Fig 18D)。しかし、5mM NAM 添加 1 時間後にはすべての細胞で EYFP 発現が誘導され、*sir3Δ*の結果と同様に EYFP が高発現し、細胞間の不均一性は観察されなかった。これらの結果は、Sir2 の HDAC 活性が個々の細胞における *IMD2*領域での不均一な発現状態を制御していることを示唆している。次に、IMPDH を介さないサルベージ経路にて GTP を生合成するのに必要なグアニンを添加し、1 細胞追跡を行うことで、*IMD2*の発現状態を制御することが知られている GTP の効果を確かめた。培養は 1 細胞から開始し、培養 8 時間後に最終濃度 0.5 mM のグアニンを添加し、すべての細胞を 15 分間隔で 12 時間まで追跡し (Fig 18E)、各細胞における EYFP の蛍光強度を測定した。グアニン添加前は細胞によって発現状態に多様性があったが、グアニン添加後はすべての細胞で EYFP の蛍光が減少した (Fig 18F)。しかし、個々の細胞で EYFP が OFF に切り替わるタイミングが異なっていたことから、GTP 濃度、ひいては *IMD2*の発現制御が細胞間で異なっていることが示唆された。これらの結果は、個々の細胞の *IMD2*領域のヘテロクロマチンが GTP に依存して変動し、*IMD2*の多様な発現状態を制御していることを示している。

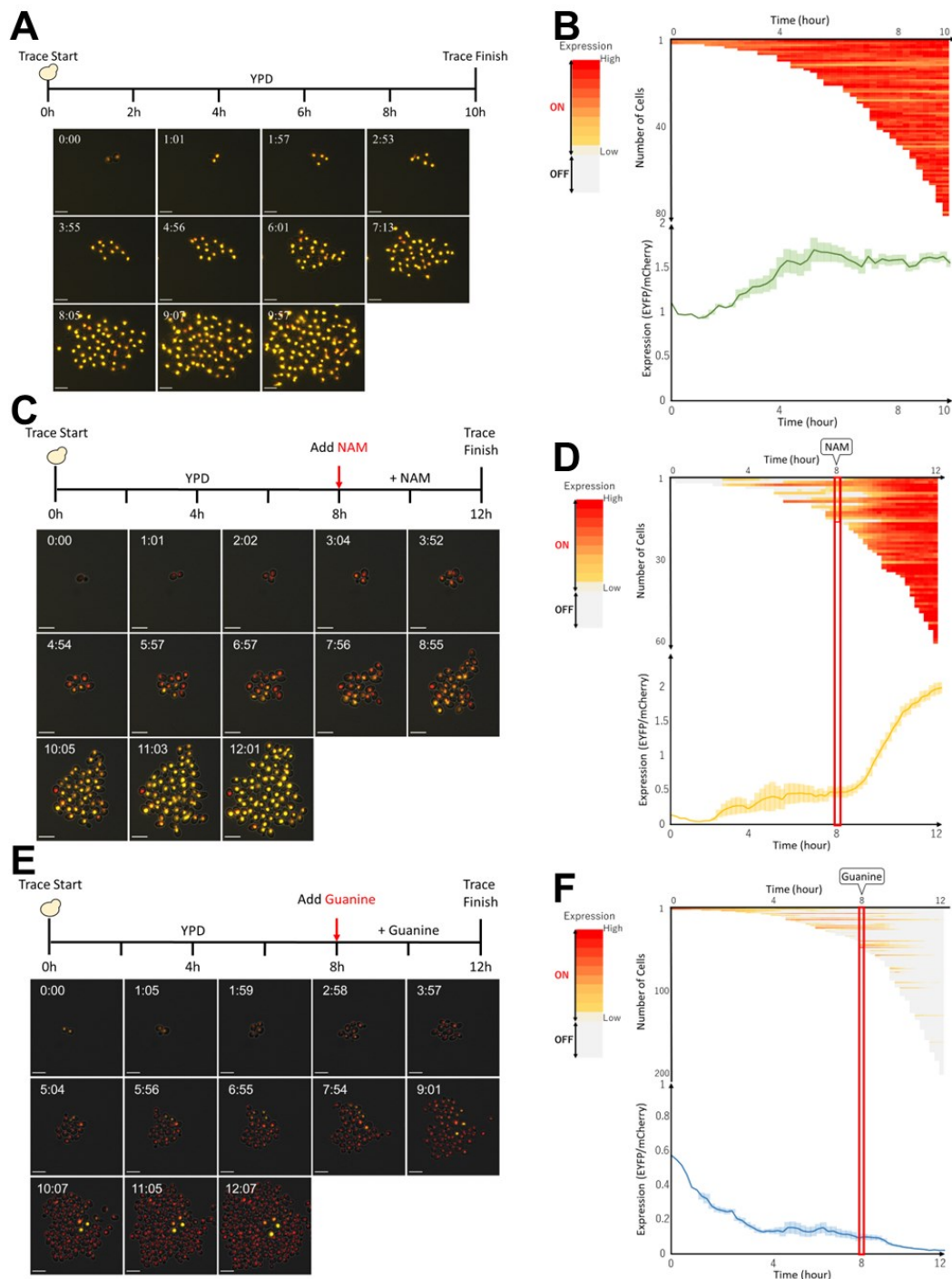


Fig 18. HDAC and GTP regulate *IMD2* intercellular heterogeneity. (A) Single-cell tracking image of the *sir3Δ* strain. Scale bars: 10 μ m. (B) Expression state analysis of (A). (C) Single-cell tracking image of the WT upon NAM treatment. Scale bars: 10 μ m. (D) Expression state analysis of (C). The red border indicates the start of the NAM addition. (E) Single-cell tracking results of WT with guanine. Scale bars:

10 μ m. (F) Expression state analysis of (E). The red rectangle indicates the start of guanine addition. In (B), (D), and (F), Upper panel: expression state change in one cell (gray [OFF]; yellow [ON, low]; and red [ON]). The horizontal axis represents the time, and the vertical axis represents the cell number. Lower panel: the expression level change of a cell population is indicated by a line graph. The horizontal axis represents the time, and the vertical axis represents the cell number. The median expression level of all cells is shown as a broken line, and the error bars represent the standard deviation.

4.3.5 考察

ヘテロクロマチンは特定のゲノム領域から広がるが、どこにでも広がるわけではない。ヘテロクロマチン（サイレンシング）の伸長は境界が形成されることで停止し、特定の場所にもみヘテロクロマチン領域が形成される。また、ヘテロクロマチン領域は細胞分裂の繰り返しによって変動するが、細胞内外の変化に關与する遺伝子の発現が、このようなヘテロクロマチン領域の変動によって制御されているかどうかは不明である。本研究では、テロメア近傍のヘテロクロマチンにおける *IMD2* の発現が、GTP の減少によって引き起こされ、ヘテロクロマチンの変動により誘導されることを見いだした。エネルギー量に応じたヘテロクロマチンの制御システムは、他の真核生物にも存在する可能性がある。さらに詳細な解析を進めることで、ヘテロクロマチンの変動によって遺伝子発現がどのように制御されているのか、また特定の遺伝子発現の制御にはどのような因子が關与しているのかが明らかになるとともに、新たな遺伝子発現制御機構の発見にもつながると期待される。

IMD2 遺伝子の転写は、GTP レベルに依存する転写開始部位の変化によって制御されている。*IMD2* 領域は DNA 配列特異的な転写制御に関して詳細に研究されており、エピジェネティックな遺伝子発現制御機構の解明に適している。ここで我々は、*IMD2* のヘテロクロマチン領域が生体内 GTP レベルに応答することを示し (Fig 14、15C、15D)、各細胞の異なる発現状態が細胞内の GTP 量によって制御されており、GTP レベルを反映して発現状態が変動していることを示唆した (Fig 18E,F)。実際、単一細胞では G1 から S 期初期まで *IMD2* の発現誘導が観察された (Fig 17A)。この結果は、有糸分裂期の GTP 消費によって生体内の GTP レベルが閾値以下に低下し、*IMD2* の発現が誘導された可能性を示しており、細胞内の GTP 量に応じて発現状態が細かく制御されるメカニズムの存在を示唆している。さらに、MPA 非添加 (0 μ g/mL) での転写レベルは、MPA 添加 (0.060 μ g/mL) 時の約 4 分の 1 に過ぎなかった (Fig 14)。これは薬剤非添加時の発現状態の変化は、急激な GTP の減少を補うわけではなく、通常の生育を維持するために作用することを示している。対照的に、MPA 添加 (0.060-0.150 μ g/mL) による発現誘導は、GTP の急激な減少に対応して

高い発現レベルを示した。これは、生命維持に支障をきたすほど GTP が枯渇すると、*IMD2* は配列依存的な制御と転写開始部位の切り替えによって、細胞の恒常性を回復させるために GTP 産生を促進したと考えられる (Fig 14)。このように、*IMD2* は、生理的に変動する GTP の第一段階のエピジェネティック制御、MPA のような外部刺激による GTP 枯渇時の第二段階のエピジェネティック制御、致死的な GTP 枯渇時の第三段階の遺伝的制御からなる三段階の機構によって制御されている。この 3 段階の発現制御機構は、生体内でも GTP 量を制御している可能性がある。GTP は核-細胞質輸送、DNA 合成、細胞分裂といった重要な生命現象に関与しているだけでなく、GTP が過剰になると細胞分裂が過剰になるため、そのレベルは恒常的な生存にとっても重要である。したがって、GTP レベルが *IMD2* のような GTP 合成に関与する遺伝子の発現を微調整するのは当然のことである。GTP レベルに応答するヘテロクロマチンの変動による遺伝子発現のエピジェネティックな制御は、出芽酵母と他の真核生物との間で保存されている可能性があり、今後の解析でこの可能性が解明されることが期待される。*IMD2* はヘテロクロマチン領域内に位置し、抑制されているにもかかわらず集団内の約 30-40% の細胞で常に発現している (Fig 17B)。同様のシステムはマウス ES 細胞のような多細胞生物にも存在し、特定の遺伝子が集団において一部の細胞でのみ発現していることが報告されている [92-94]。また、酵母では細胞分裂によって個々の細胞で発現状態が変化するものの、集団では常に安定した割合で ON 発現状態が維持されている。しかし、*SIR3* を破壊すると、ほとんどすべての細胞で *IMD2* の発現が ON になることから、*IMD2* の発現はヘテロクロマチン領域の変動によって制御されていることが示唆された。しかし、酵母が細胞集団全体の遺伝子発現状態の比率を制御するためにどのような機構を導入しているのかは、現在のところ不明である。

本研究では、MPA 誘導前から *IMD2* を発現している細胞も同定し、この正常な発現状態が GTP 依存的にエピジェネティックに制御されていることを見出した (図 4A)。しかし、この発現状態が MPA による誘導にどのように影響するかは明らかにならなかった。ある種の遺伝子では、一度発現が誘導されると、再誘導時に初回よりも強く速く誘導され [95]、この現象は転写記憶と呼ばれ、近年注目されている。したがって、MPA 処理前の各細胞の発現状態の変化が、その後の発現誘導に影響を与えた可能性がある。

我々は、ヘテロクロマチン領域が形成され、GTP に応答して変動し、*IMD2* 領域で遺伝子の発現状態を制御していることを明らかにした。しかし、細胞内の GTP センサー、GTP の量を検知する細胞領域、GTP の減少によって *IMD2* 遺伝子座のクロマチン構造がどのように変化するのか、あるいはその過程に関与する因子を同定することはできなかった。

5 結言

本学位論文では、初めにこれまで不明瞭であった、SAGA-TBPによるヘテロクロマチン制御を報告する中で、3番染色体右腕ではTBPと相互作用するSpt3が重要な役割を果たしていることを明らかにした。次に、Spt3とSpt8の作用の染色体特異性を明らかにするため、8番染色体右腕でヘテロクロマチンの影響下に在る遺伝子*IMD2*に注目し、Spt8が優位に機能することを見出した。また、*IMD2*領域ではSAGAの他に複数のHAT関連因子がヘテロクロマチン制御に関わり、*IMD2*の発現状態を調整していることを明らかにした。そこで最後に、様々な境界制御因子により制御されているヘテロクロマチン領域の変動が生じるメカニズムを解明するため、*IMD2*に注目した。その結果、*IMD2*領域では生体内のGTPレベルの減少に応じてヘテロクロマチン領域が変動することで、細胞の恒常的な生育が保たれていることが示唆された。

しかし、本報告ではSAGA複合体や様々なHAT関連因子が生体内のGTP量に応答して*IMD2*領域で機能している可能性を示唆したが、GTP量の変化からクロマチン制御に至るまでの中間イベントは未だに明らかになっていない。今後は更なる解析により、生体内エネルギーの変化からクロマチン制御にいたる過程を明らかにする。

6 参考文献

1. Imai, S., et al., *Transcriptional silencing and longevity protein Sir2 is an NAD-dependent histone deacetylase*. Nature, 2000. **403**(6771): p. 795-800.
2. Rusche, L.N., A.L. Kirchmaier, and J. Rine, *The establishment, inheritance, and function of silenced chromatin in Saccharomyces cerevisiae*. Annu Rev Biochem, 2003. **72**: p. 481-516.
3. Sun, J.Q., A. Hatanaka, and M. Oki, *Boundaries of transcriptionally silent chromatin in Saccharomyces cerevisiae*. Genes Genet Syst, 2011. **86**(2): p. 73-81.
4. Gartenberg, M.R. and J.S. Smith, *The Nuts and Bolts of Transcriptionally Silent Chromatin in Saccharomyces cerevisiae*. Genetics, 2016. **203**(4): p. 1563-99.
5. Mitsumori, R., et al., *Analysis of novel Sir3 binding regions in Saccharomyces cerevisiae*. J Biochem, 2016. **160**(1): p. 11-7.
6. Smith, J.S. and J.D. Boeke, *An unusual form of transcriptional silencing in yeast ribosomal DNA*. Genes Dev, 1997. **11**(2): p. 241-54.
7. Ghidelli, S., et al., *Sir2p exists in two nucleosome-binding complexes with distinct deacetylase activities*. EMBO J, 2001. **20**(16): p. 4522-35.
8. Ellahi, A., D.M. Thurtle, and J. Rine, *The Chromatin and Transcriptional Landscape of Native *Saccharomyces cerevisiae* Telomeres and Subtelomeric Domains*. Genetics, 2015. **200**(2): p. 505-521.
9. Oh, J., et al., *The regional sequestration of heterochromatin structural proteins is critical to form and maintain silent chromatin*. Epigenetics Chromatin, 2022. **15**(1): p. 5.
10. Yeom, S., J. Oh, and J.S. Lee, *Spreading-dependent or independent Sir2-mediated gene silencing in budding yeast*. Genes Genomics, 2022. **44**(3): p. 359-367.
11. Saxton, D.S. and J. Rine, *Distinct silencer states generate epigenetic states of heterochromatin*. Mol Cell, 2022. **82**(19): p. 3566-3579 e5.
12. Oki, M. and R.T. Kamakaka, *Blockers and barriers to transcription: competing activities?* Curr Opin Cell Biol, 2002. **14**(3): p. 299-304.
13. Oki, M., et al., *Barrier proteins remodel and modify chromatin to restrict silenced domains*. Mol Cell Biol, 2004. **24**(5): p. 1956-67.
14. Donze, D., et al., *The boundaries of the silenced HMR domain in*

- Saccharomyces cerevisiae*. Genes Dev, 1999. **13**(6): p. 698-708.
15. Donze, D. and R.T. Kamakaka, *RNA polymerase III and RNA polymerase II promoter complexes are heterochromatin barriers in Saccharomyces cerevisiae*. EMBO J, 2001. **20**(3): p. 520-31.
 16. Oki, M. and R.T. Kamakaka, *Barrier function at HMR*. Mol Cell, 2005. **19**(5): p. 707-16.
 17. Kimura, A., T. Umehara, and M. Horikoshi, *Chromosomal gradient of histone acetylation established by Sas2p and Sir2p functions as a shield against gene silencing*. Nat Genet, 2002. **32**(3): p. 370-7.
 18. Suka, N., K. Luo, and M. Grunstein, *Sir2p and Sas2p opposingly regulate acetylation of yeast histone H4 lysine16 and spreading of heterochromatin*. Nat Genet, 2002. **32**(3): p. 378-83.
 19. Kimura, A. and M. Horikoshi, *Partition of distinct chromosomal regions: negotiable border and fixed border*. Genes Cells, 2004. **9**(6): p. 499-508.
 20. John, S., et al., *The something about silencing protein, Sas3, is the catalytic subunit of NuA3, a yTAF(II)30-containing HAT complex that interacts with the Spt16 subunit of the yeast CP (Cdc68/Pob3)-FACT complex*. Genes Dev, 2000. **14**(10): p. 1196-208.
 21. Smith, E.R., et al., *ESA1 is a histone acetyltransferase that is essential for growth in yeast*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(7): p. 3561-5.
 22. Allard, S., et al., *NuA4, an essential transcription adaptor/histone H4 acetyltransferase complex containing Esa1p and the ATM-related cofactor Tra1p*. EMBO J, 1999. **18**(18): p. 5108-19.
 23. Babiarz, J.E., J.E. Halley, and J. Rine, *Telomeric heterochromatin boundaries require NuA4-dependent acetylation of histone variant H2A.Z in Saccharomyces cerevisiae*. Genes Dev, 2006. **20**(6): p. 700-10.
 24. Millar, C.B., et al., *Acetylation of H2AZ Lys 14 is associated with genome-wide gene activity in yeast*. Genes Dev, 2006. **20**(6): p. 711-22.
 25. D'Arcy, S. and K. Luger, *Understanding histone acetyltransferase Rtt109 structure and function: how many chaperones does it take?* Curr Opin Struct Biol, 2011. **21**(6): p. 728-34.
 26. Carmen, A.A., S.E. Rundlett, and M. Grunstein, *HDA1 and HDA3 are components of a yeast histone deacetylase (HDA) complex*. J Biol Chem, 1996. **271**(26): p. 15837-44.
 27. Wu, J., et al., *HDA2 and HDA3 are related proteins that interact with*

- and are essential for the activity of the yeast histone deacetylase HDA1.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(8): p. 4391-6.
28. Taunton, J., C.A. Hassig, and S.L. Schreiber, *A mammalian histone deacetylase related to the yeast transcriptional regulator Rpd3p.* Science, 1996. **272**(5260): p. 408-11.
 29. Hatanaka, A., et al., *Fub1p, a novel protein isolated by boundary screening, binds the proteasome complex.* Genes Genet Syst, 2011. **86**(5): p. 305-14.
 30. Mitsumori, R., et al., *Gic1 is a novel heterochromatin boundary protein in vivo.* Genes Genet Syst, 2016. **91**(3): p. 151-159.
 31. Feng, Q., et al., *Methylation of H3-lysine 79 is mediated by a new family of HMTases without a SET domain.* Curr Biol, 2002. **12**(12): p. 1052-8.
 32. Lacoste, N., et al., *Disruptor of telomeric silencing-1 is a chromatin-specific histone H3 methyltransferase.* J Biol Chem, 2002. **277**(34): p. 30421-4.
 33. van Leeuwen, F., P.R. Gafken, and D.E. Gottschling, *Dot1p modulates silencing in yeast by methylation of the nucleosome core.* Cell, 2002. **109**(6): p. 745-56.
 34. Wery, M., et al., *Members of the SAGA and Mediator complexes are partners of the transcription elongation factor TFIIS.* EMBO J, 2004. **23**(21): p. 4232-42.
 35. Han, Y., et al., *Architecture of the Saccharomyces cerevisiae SAGA transcription coactivator complex.* EMBO J, 2014. **33**(21): p. 2534-46.
 36. Setiাপutra, D., et al., *Conformational flexibility and subunit arrangement of the modular yeast Spt-Ada-Gcn5 acetyltransferase complex.* J Biol Chem, 2015. **290**(16): p. 10057-70.
 37. Liu, G., et al., *Architecture of Saccharomyces cerevisiae SAGA complex.* Cell Discov, 2019. **5**: p. 25.
 38. Papai, G., et al., *Structure of SAGA and mechanism of TBP deposition on gene promoters.* Nature, 2020. **577**(7792): p. 711-716.
 39. Wang, H., et al., *Structure of the transcription coactivator SAGA.* Nature, 2020. **577**(7792): p. 717-720.
 40. Ben-Shem, A., G. Papai, and P. Schultz, *Architecture of the multi-functional SAGA complex and the molecular mechanism of holding TBP.* FEBS J, 2021. **288**(10): p. 3135-3147.

41. Grant, P.A., F. Winston, and S.L. Berger, *The biochemical and genetic discovery of the SAGA complex*. Biochim Biophys Acta Gene Regul Mech, 2021. **1864**(2): p. 194669.
42. Vasyliuk, D., et al., *Conformational landscape of the yeast SAGA complex as revealed by cryo-EM*. Sci Rep, 2022. **12**(1): p. 12306.
43. Kamata, K., et al., *C-terminus of the Sgf73 subunit of SAGA and SLIK is important for retention in the larger complex and for heterochromatin boundary function*. Genes Cells, 2013. **18**(9): p. 823-37.
44. Kamata, K., et al., *The N-terminus and Tudor domains of Sgf29 are important for its heterochromatin boundary formation function*. J Biochem, 2014. **155**(3): p. 159-71.
45. Kamata, K., et al., *Four domains of Ada1 form a heterochromatin boundary through different mechanisms*. Genes Cells, 2016. **21**(10): p. 1125-1136.
46. Eisenmann, D.M., et al., *SPT3 interacts with TFIID to allow normal transcription in Saccharomyces cerevisiae*. Genes Dev, 1992. **6**(7): p. 1319-31.
47. Birck, C., et al., *Human TAF(II)28 and TAF(II)18 interact through a histone fold encoded by atypical evolutionary conserved motifs also found in the SPT3 family*. Cell, 1998. **94**(2): p. 239-49.
48. Dudley, A.M., C. Rougeulle, and F. Winston, *The Spt components of SAGA facilitate TBP binding to a promoter at a post-activator-binding step in vivo*. Genes Dev, 1999. **13**(22): p. 2940-5.
49. Belotserkovskaya, R., et al., *Inhibition of TATA-binding protein function by SAGA subunits Spt3 and Spt8 at Gcn4-activated promoters*. Mol Cell Biol, 2000. **20**(2): p. 634-47.
50. Bhaumik, S.R. and M.R. Green, *Differential requirement of SAGA components for recruitment of TATA-box-binding protein to promoters in vivo*. Mol Cell Biol, 2002. **22**(21): p. 7365-71.
51. Huisinga, K.L. and B.F. Pugh, *A genome-wide housekeeping role for TFIID and a highly regulated stress-related role for SAGA in Saccharomyces cerevisiae*. Mol Cell, 2004. **13**(4): p. 573-85.
52. Liu, Y., X. Xu, and M.H. Kuo, *Snf1p regulates Gcn5p transcriptional activity by antagonizing Spt3p*. Genetics, 2010. **184**(1): p. 91-105.
53. Madison, J.M. and F. Winston, *Evidence that Spt3 functionally*

- interacts with Mot1, TFIIA, and TATA-binding protein to confer promoter-specific transcriptional control in Saccharomyces cerevisiae.* Mol Cell Biol, 1997. **17**(1): p. 287-95.
54. Hampsey, M., *Molecular genetics of the RNA polymerase II general transcriptional machinery.* Microbiol Mol Biol Rev, 1998. **62**(2): p. 465-503.
55. Hirschhorn, J.N. and F. Winston, *SPT3 is required for normal levels of a-factor and alpha-factor expression in Saccharomyces cerevisiae.* Mol Cell Biol, 1988. **8**(2): p. 822-7.
56. Pray-Grant, M.G., et al., *The novel SLIK histone acetyltransferase complex functions in the yeast retrograde response pathway.* Mol Cell Biol, 2002. **22**(24): p. 8774-86.
57. Sterner, D.E., R. Belotserkovskaya, and S.L. Berger, *SALSA, a variant of yeast SAGA, contains truncated Spt7, which correlates with activated transcription.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(18): p. 11622-7.
58. Lee, K.K. and J.L. Workman, *Histone acetyltransferase complexes: one size doesn't fit all.* Nat Rev Mol Cell Biol, 2007. **8**(4): p. 284-95.
59. Mischerikow, N., et al., *In-depth profiling of post-translational modifications on the related transcription factor complexes TFIID and SAGA.* J Proteome Res, 2009. **8**(11): p. 5020-30.
60. Woods, R.A., et al., *Hypoxanthine: guanine phosphoribosyltransferase mutants in Saccharomyces cerevisiae.* Mol Gen Genet, 1983. **191**(3): p. 407-12.
61. Hedstrom, L., *IMP dehydrogenase: mechanism of action and inhibition.* Curr Med Chem, 1999. **6**(7): p. 545-60.
62. Hyle, J.W., R.J. Shaw, and D. Reines, *Functional distinctions between IMP dehydrogenase genes in providing mycophenolate resistance and guanine prototrophy to yeast.* J Biol Chem, 2003. **278**(31): p. 28470-8.
63. Shaw, R.J., et al., *Regulation of an IMP dehydrogenase gene and its overexpression in drug-sensitive transcription elongation mutants of yeast.* J Biol Chem, 2001. **276**(35): p. 32905-16.
64. McPhillips, C.C., J.W. Hyle, and D. Reines, *Detection of the mycophenolate-inhibited form of IMP dehydrogenase in vivo.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(33): p. 12171-6.
65. Jenks, M.H. and D. Reines, *Dissection of the molecular basis of*

- mycophenolate resistance in Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 2005. **22**(15): p. 1181-90.
66. Davis, C.A. and M. Ares, Jr., *Accumulation of unstable promoter-associated transcripts upon loss of the nuclear exosome subunit Rrp6p in Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006. **103**(9): p. 3262-7.
67. Steinmetz, E.J., et al., *Genome-wide distribution of yeast RNA polymerase II and its control by Sen1 helicase*. *Mol Cell*, 2006. **24**(5): p. 735-746.
68. Kopcewicz, K.A., T.W. O'Rourke, and D. Reines, *Metabolic regulation of IMD2 transcription and an unusual DNA element that generates short transcripts*. *Mol Cell Biol*, 2007. **27**(8): p. 2821-9.
69. Shaw, R.J. and D. Reines, *Saccharomyces cerevisiae transcription elongation mutants are defective in PUR5 induction in response to nucleotide depletion*. *Mol Cell Biol*, 2000. **20**(20): p. 7427-37.
70. Escobar-Henriques, M. and B. Daignan-Fornier, *Transcriptional regulation of the yeast gmp synthesis pathway by its end products*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(2): p. 1523-30.
71. Escobar-Henriques, M., B. Daignan-Fornier, and M.A. Collart, *The critical cis-acting element required for IMD2 feedback regulation by GDP is a TATA box located 202 nucleotides upstream of the transcription start site*. *Mol Cell Biol*, 2003. **23**(17): p. 6267-78.
72. Jenks, M.H., T.W. O'Rourke, and D. Reines, *Properties of an intergenic terminator and start site switch that regulate IMD2 transcription in yeast*. *Mol Cell Biol*, 2008. **28**(12): p. 3883-93.
73. Kuehner, J.N. and D.A. Brow, *Regulation of a eukaryotic gene by GTP-dependent start site selection and transcription attenuation*. *Mol Cell*, 2008. **31**(2): p. 201-11.
74. Connell, Z., et al., *The interaction between the Spt6-tSH2 domain and Rpb1 affects multiple functions of RNA Polymerase II*. *Nucleic Acids Res*, 2022. **50**(2): p. 784-802.
75. Henry, N.L., D.A. Bushnell, and R.D. Kornberg, *A yeast transcriptional stimulatory protein similar to human PC4*. *J Biol Chem*, 1996. **271**(36): p. 21842-7.
76. Knaus, R., R. Pollock, and L. Guarente, *Yeast SUB1 is a suppressor of TFIIB mutations and has homology to the human co-activator PC4*.

- EMBO J, 1996. **15**(8): p. 1933-40.
77. Koyama, H., et al., *Transcriptional repression of the IMD2 gene mediated by the transcriptional co-activator Sub1*. Genes Cells, 2008. **13**(11): p. 1113-26.
 78. Sliva, A., et al., *Barcode Sequencing Screen Identifies SUB1 as a Regulator of Yeast Pheromone Inducible Genes*. G3 (Bethesda), 2016. **6**(4): p. 881-92.
 79. Desmoucelles, C., et al., *Screening the yeast "disruptome" for mutants affecting resistance to the immunosuppressive drug, mycophenolic acid*. J Biol Chem, 2002. **277**(30): p. 27036-44.
 80. Ubukata, T., et al., *Cleavage, but not read-through, stimulation activity is responsible for three biologic functions of transcription elongation factor S-II*. J Biol Chem, 2003. **278**(10): p. 8580-5.
 81. Torres-Garcia, S., et al., *Epigenetic gene silencing by heterochromatin primes fungal resistance*. Nature, 2020. **585**(7825): p. 453-458.
 82. Yaseen, I., et al., *Proteasome-dependent truncation of the negative heterochromatin regulator Epe1 mediates antifungal resistance*. Nat Struct Mol Biol, 2022. **29**(8): p. 745-758.
 83. Beltran, T., et al., *Epimutations driven by small RNAs arise frequently but most have limited duration in Caenorhabditis elegans*. Nat Ecol Evol, 2020. **4**(11): p. 1539-1548.
 84. Wilson, R., et al., *Fluctuations in chromatin state at regulatory loci occur spontaneously under relaxed selection and are associated with epigenetically inherited variation in C. elegans gene expression*. PLoS Genet, 2023. **19**(3): p. e1010647.
 85. Mano, Y., et al., *Single cell visualization of yeast gene expression shows correlation of epigenetic switching between multiple heterochromatic regions through multiple generations*. PLoS Biol, 2013. **11**(7): p. e1001601.
 86. Laprade, L., D. Rose, and F. Winston, *Characterization of new Spt3 and TATA-binding protein mutants of Saccharomyces cerevisiae: Spt3 TBP allele-specific interactions and bypass of Spt8*. Genetics, 2007. **177**(4): p. 2007-17.
 87. Stargell, L.A. and K. Struhl, *A new class of activation-defective TATA-binding protein mutants: evidence for two steps of transcriptional activation in vivo*. Mol Cell Biol, 1996. **16**(8): p. 4456-64.

88. Larschan, E. and F. Winston, *The S. cerevisiae SAGA complex functions in vivo as a coactivator for transcriptional activation by Gal4*. Genes Dev, 2001. **15**(15): p. 1946-56.
89. Sermwittayawong, D. and S. Tan, *SAGA binds TBP via its Spt8 subunit in competition with DNA: implications for TBP recruitment*. EMBO J, 2006. **25**(16): p. 3791-800.
90. Bitterman, K.J., et al., *Inhibition of silencing and accelerated aging by nicotinamide, a putative negative regulator of yeast sir2 and human SIRT1*. J Biol Chem, 2002. **277**(47): p. 45099-107.
91. Avalos, J.L., K.M. Bever, and C. Wolberger, *Mechanism of sirtuin inhibition by nicotinamide: altering the NAD(+) cosubstrate specificity of a Sir2 enzyme*. Mol Cell, 2005. **17**(6): p. 855-68.
92. Zalzman, M., et al., *Zscan4 regulates telomere elongation and genomic stability in ES cells*. Nature, 2010. **464**(7290): p. 858-63.
93. Amano, T., et al., *Zscan4 restores the developmental potency of embryonic stem cells*. Nat Commun, 2013. **4**: p. 1966.
94. Ko, M.S., *Zygotic Genome Activation Revisited: Looking Through the Expression and Function of Zscan4*. Curr Top Dev Biol, 2016. **120**: p. 103-24.
95. Bheda, P., et al., *Single-Cell Tracing Dissects Regulation of Maintenance and Inheritance of Transcriptional Reinduction Memory*. Mol Cell, 2020. **78**(5): p. 915-925 e7.

7 謝辞

本研究を行うにあたり、終始適切な御指導、御鞭撻を賜りました沖昌也教授に厚く感謝の意を表します。

また、DNA マイクロアレイ解析をサポートして下さった福井大学バイオ実験機器部門の柄谷和宏助教授に深く感謝とお礼を申し上げます。